

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Andrea Hájková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ STOPOVÝCH MNOŽSTVÍ
GENOTOXICKÉHO 2-AMINOFLUOREN-9-ONU

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF TRACE AMOUNTS
OF GENOTOXIC 2-AMINOFLUOREN-9-ONE

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44) a Technologickou agenturou České republiky (projekt TA01020565).

Prohlášení

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci širšího projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2010 – 2012, který se věnuje studiu elektrochemického chování biologicky aktivních organických látek, které jsou významné z hlediska ochrany životního prostředí, farmacie a toxikologie.

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2012

.....

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé diplomové práci. Dále chci poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc., RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D., Ing. Bogdanu Yosypchukovi, Ph.D. (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha) a ostatním členům Katedry analytické chemie za ochotu a pomoc v průběhu mé diplomové práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině, že mě podporuje a umožňuje mi studium na vysoké škole.

Děkuji.

Abstrakt diplomové práce

Předkládaná diplomová práce se zabývá elektrochemickým stanovením genotoxického 2-aminofluoren-9-onu (2-AFN), který patří mezi deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků. Jeho potenciální karcinogenní a mutagenní účinky mohou být příčinou ohrožení životního i pracovního prostředí.

Optimální podmínky pro voltametrické stanovení 2-AFN byly nalezeny ve vhodném poměru pufované vodné a methanolické fáze. V prostředí methanol – Brittonův-Robinsonův (BR) pufr (1:9) bylo měřeno voltametrické chování 2-AFN o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v závislosti na pH analyzovaného roztoku v rozmezí pH 2,0 až 13,0 a pro proměření koncentračních závislostí bylo vybráno optimální prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Dosažené meze stanovitelnosti (L_Q) činily 2×10^{-7} mol/l pro DC voltametrii (DCV) a 1×10^{-7} mol/l pro diferenční pulsní voltametrii (DPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). V prostředí acetátového pufru o pH 4,0 byla adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrii (AdSDPV) na HMDE při optimálních podmínkách akumulace $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s dosažena $L_Q \approx 4 \times 10^{-9}$ mol/l. Pro voltametrické stanovení 2-AFN na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE) ve stejných prostředích jako na HMDE byly použity následující techniky: DCV ($L_Q \approx 2 \times 10^{-7}$ mol/l), DPV ($L_Q \approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) a AdSDPV ($L_Q \approx 1 \times 10^{-8}$ mol/l při $E_{acc} = +200$ mV a $t_{acc} = 180$ s).

Praktická aplikovatelnost nově vyvinutých voltametrických metod stanovení 2-AFN byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody. Pomocí extrakce tuhou fází (SPE) a následném stanovení metodou AdSDPV na HMDE při optimálních podmínkách v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 bylo dosaženo až o dva řády nižší hodnoty $L_Q \approx 4 \times 10^{-11}$ mol/l. Dále byl také zkoušen nově zkonstruovaný miniaturizovaný systém elektrod, který by umožnil jednoduché terénní měření a stanovení analytu ve 100 μ l objemech vzorku.

Mechanismus redukce oxoskupiny 2-AFN byl zkoumán technikou cyklické voltametrie (CV) na HMDE a m-AgSAE a byla rovněž provedena srovnávací CV měření redukce fluoren-9-onu. Pomocí potenciostatické coulometrie na rtuťovém dně byl potvrzen předpokládaný počet vyměňovaných elektronů při redukci 2-AFN.

Nanomolární až subnanomolární meze stanovitelnosti 2-AFN dosažené pomocí výše uvedených voltametrických metod byly porovnány s fluorimetrickým stanovením 2-AFN v prostředí methanolu ($L_Q \approx 2 \times 10^{-6}$ mol/l). Takto bylo prokázáno, že mez stanovitelnosti 2-AFN dosažená pomocí AdSDPV na HMDE s předřazenou prekoncentrací analytu pomocí SPE je o několik koncentračních řádů nižší oproti běžným spektrometrickým metodám.

Abstract of the Diploma Thesis

Presented Diploma Thesis is focused on the electrochemical determination of genotoxic 2-aminofluoren-9-one (2-AFN), which belongs to derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. Its possible carcinogenic and mutagenic effects may represent a risk to living and working environment.

Optimal conditions for the voltammetric determination of 2-AFN were found in an appropriate ratio of buffered aqueous and methanolic phase. In the methanol – Britton-Robinson (BR) buffer (1:9) medium, voltammetric behavior of 2-AFN at a concentration of 1×10^{-4} mol/l was investigated in a dependence on the pH of the solution in the range from 2.0 to 13.0. For following measurements of concentration dependences, the optimal medium was chosen to be methanol – BR buffer of pH 4.0 (1:9). The achieved limits of quantification (L_Q) were 2×10^{-7} mol/l for DC voltammetry (DCV) and 1×10^{-7} mol/l for differential pulse voltammetry (DPV) at a hanging mercury drop electrode (HMDE). In the medium of an acetate buffer of pH 4.0, the L_Q attained using adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV) at the HMDE under optimal conditions for the accumulation of the analyte ($E_{acc} = +100$ mV and $t_{acc} = 120$ s) was 4×10^{-9} mol/l of 2-AFN. For the voltammetric determination of 2-AFN at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) in the same media as used for measurements at the HMDE, following techniques were used: DCV ($L_Q \approx 2 \times 10^{-7}$ mol/l), DPV ($L_Q \approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) and AdSDPV ($L_Q \approx 1 \times 10^{-8}$ mol/l, $E_{acc} = +200$ mV and $t_{acc} = 180$ s).

The practical applicability of the newly developed voltammetric methods for the determination of 2-AFN was verified on model samples of drinking water and river water. Using a solid phase extraction (SPE) and subsequent AdSDPV measurements at the HMDE (under the optimal conditions for the accumulation of the analyte in the acetate buffer of pH 4.0), the L_Q for up to two orders of magnitude lower was achieved ($L_Q \approx 4 \times 10^{-11}$ mol/l). Moreover, a newly constructed miniaturized electrode system, that would allow simple field measurements and the determination of the analyte in 100- μ l sample volumes, was also tested.

The mechanism of reduction of the oxo group in 2-AFN was investigated by cyclic voltammetry (CV) at the HMDE and m-AgSAE, and then it was compared with results obtained using CV measurements of fluoren-9-one. Using a potentiostatic coulometry at a mercury pool electrode, the expected number of electrons exchanged upon the reduction of 2-AFN was confirmed.

The nanomolar to subnanomolar L_Q s of 2-AFN achieved using the aforementioned voltammetric methods were compared with a fluorimetric determination of 2-AFN in methanol ($L_Q \approx 2 \times 10^{-6}$ mol/l). Thus, it was shown that the L_Q of 2-AFN attained using AdSDPV at the HMDE preceded by the preconcentration of the analyte using SPE is several orders of magnitude lower compared to common spectrometric methods.

Předmětová hesla: analytická chemie
elektrochemie
voltametrie
coulometrie
extrakce tuhou fází
fluorimetrie
deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Klíčová slova: 2-aminofluoren-9-on
DC voltametrie
diferenční pulsní voltametrie
adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie
cyklická voltametrie
visící rtuťová kapková elektroda
rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda

Objective Words: Analytical Chemistry
Electrochemistry
Voltammetry
Coulometry
Solid Phase Extraction
Fluorimetry
Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Key Words: 2-Aminofluoren-9-one
DC Voltammetry
Differential Pulse Voltammetry
Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetry
Cyclic Voltammetry
Hanging Mercury Drop Electrode
Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode

Seznam použitých zkratk a symbolů

2-AFN	2-aminofluoren-9-on
AdSDPV	adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie
APAU	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol/l]
CPC	coulometrie za konstantního potenciálu
CV	cyklická voltametrie
DCTP	DC tast polarografie
DCV	DC voltametrie
DME	klasická kapající rtuťová elektroda
DMF	N,N-dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP	diferenční pulsní polarografie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E_p	potenciál píku [mV]
E_{acc}	potenciál akumulace [mV]
E_{elec}	potenciál elektrolýzy [mV]
$E_{reg,1}$	první kladnější regenerační potenciál [mV]
$E_{reg,2}$	druhý zápornější regenerační potenciál [mV]
F	Faradayova konstanta (96 485 C/mol)
FN	fluoren-9-on
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
k_{teor}	teoretický prekoncentrační faktor extrakce tuhou fází
I_0	proud píku před zahájením potenciostatické coulometrie [nA]
I_1	proud píku po skončení potenciostatické coulometrie [nA]
I_p	proud píku [nA]
I_F	intenzita fluorescenčního záření
L_Q	mez stanovitelnosti [mol/l]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda
MPE	rtuťové dno pro měření potenciostatické coulometrie
Δn	změna látkového množství
N	počet měření

OPAU	oxoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových ionů
pH [*]	pH směsného vodně-methanolického prostředí
Q	náboj látky spotřebovaný při elektrolýze [mC]
Q_{ze}	náboj spotřebovaný při elektrolýze základního elektrolytu [mC]
R^2	koefficient determinace
s_r	relativní směrodatná odchylka [%]
SPE	extrakce tuhou fází
t_{acc}	čas akumulace [s]
UV-Vis	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
ν	rychlost polarizace [mV/s]
z	počet vyměňovaných elektronů
λ_{em}	emisní vlnová délka [nm]
λ_{ex}	excitační vlnová délka [nm]

Obsah

1. Teoretický úvod	11
1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce	11
1.2 Cíle diplomové práce	12
1.3 Studovaná látka	12
1.4 Obecné vlastnosti oxo- a aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků	13
1.4.1 Oxoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků	13
1.4.2 Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků	14
1.5 Vznik, výskyt, využití a vlastnosti derivátů fluorenu	15
1.5.1 Fluoren	15
1.5.2 Fluoren-9-on	16
1.5.3 2-Aminofluoren	16
1.5.4 2-Aminofluoren-9-on	17
1.6 Spektrometrické, separační a elektrochemické studium derivátů fluorenu	18
1.6.1 Spektrometrické metody výzkumu derivátů fluorenu	18
1.6.2 Separační metody využívané při stanovení derivátů fluorenu	19
1.6.3 Elektrochemické metody stanovení derivátů fluorenu	20
1.7 Pracovní elektrody	21
2. Experimentální část	22
2.1 Reagencie	22
2.2 Aparatura	22
2.3 Použité pracovní elektrody	23
2.3.1 Visící rtuťová kapková elektroda	23
2.3.2 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda	23
2.4 Pracovní postupy	25
3. Voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu na visící rtuťové kapkové elektrodě	26
3.1 DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie	26
3.1.1 Vliv pH na voltametrické chování 2-aminofluoren-9-onu	26
3.1.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu	29
3.2 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie	32
3.2.1 Optimalizace podmínek pro voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu	32
3.2.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu	34

4. Voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě	36
4.1 DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie.....	36
4.1.1 Vliv pH na voltametrické chování 2-aminofluoren-9-onu	36
4.1.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu	40
4.2 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie	42
4.2.1 Optimalizace podmínek pro voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu .	42
4.2.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu	44
5. Stanovení 2-aminofluoren-9-onu v modelových vzorcích pitné a říční vody.....	45
6. Předběžná separace a prekoncentrace 2-aminofluoren-9-onu pomocí extrakce tuhou fází.....	50
6.1 Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází.....	50
6.2 Stanovení 2-aminofluoren-9-onu po extrakci tuhou fází	52
6.2.1 Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z deionizované vody.....	52
6.2.2 Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z pitné a říční	56
7. Miniaturizovaný systém elektrod	60
8. Mechanismus redukce 2-aminofluoren-9-onu	64
8.1 Coulometrie 2-aminofluoren-9-onu	64
8.2 Cyklická voltametrie 2-aminofluoren-9-onu	70
8.2.1 Cyklická voltametrie na HMDE	71
8.2.2 Cyklická voltametrie na m-AgSAE	74
8.3 Porovnání cyklické voltametrie 2-aminofluoren-9-onu a fluoren-9-onu	76
8.3.1 Porovnání cyklické voltametrie na HMDE	76
8.3.2 Porovnání cyklické voltametrie na m-AgSAE	78
9. Fluorimetrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu.....	80
9.1 Optimalizace podmínek pro fluorescenční měření	80
9.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu	81
10. Shrnutí výsledků	83
11. Literatura	87

1. Teoretický úvod

1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce

Tato diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci s názvem „Polarografické stanovení genotoxického 2-amino-9-fluorenonu“, která pojednávala o polarografickém chování a vývoji metod pro stanovení genotoxického 2-aminofluoren-9-onu (2-AFN) na klasické kapající rtuťové elektrodě (DME) pomocí technik DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) [1,2]. Cílem bakalářské práce bylo nalézt optimální podmínky pro polarografické stanovení 2-AFN, dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti (L_Q) 2-AFN a jejich porovnání s UV-Vis spektrofotometrickým stanovením 2-AFN.

Nejprve byla pomocí UV-Vis spektrofotometrie sledována stabilita zásobního roztoku 2-AFN v methanolu a zjištěn vhodný poměr pufované vodné a methanolicke fáze pro následná polarografická měření. Závislost polarografického chování 2-AFN o koncentraci 1×10^{-4} mol/l na změně pH analyzovaného roztoku byla měřena v rozmezí pH 1,9 až 12,8 v prostředí methanol – Brittonův-Robinsonův (BR) pufr (1:9). Pro elektrochemicky redukovatelnou oxoskupinu, kterou obsahuje struktura 2-AFN, byl na základě pozorovaného chování navrhnout mechanismus její polarografické redukce na DME. Pro proměření koncentračních závislostí bylo vybráno optimální prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) pro obě polarografické techniky. Technikou DCTP na DME bylo proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol/l a technikou DPP na DME 1×10^{-7} až 1×10^{-4} mol/l. Dosažené L_Q činily 5×10^{-7} mol/l (pro DCTP na DME) a 1×10^{-7} mol/l (pro DPP na DME).

Spektrofotometrické stanovení 2-AFN UV-Vis technikou bylo provedeno za účelem srovnání s nově vypracovanými polarografickými metodami stanovení 2-AFN. Bylo proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-5} mol/l jednak v čistém methanolu (při vlnové délce absorpčního maxima 274 nm) a také v optimálním prostředí pro polarografická stanovení, tj. v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) (při vlnové délce absorpčního maxima 272 nm), kdy pro obě prostředí byla $L_Q \approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l. Z uvedených výsledků vyplývalo, že L_Q dosažené pomocí nově vyvinutých polarografických metod stanovení 2-AFN jsou srovnatelné s L_Q dosaženými pomocí UV-Vis spektrofotometrie. DPP na DME bylo možné označit jako alternativní analytickou metodu k UV-Vis spektrofotometrickému stanovení 2-AFN [1].

1.2 Cíle diplomové práce

S neustálým rozvojem průmyslu stoupá znečištění životního prostředí toxickými látkami, proto je také velmi důležitý jejich výzkum a monitorování, k němuž je zapotřebí vyvíjet citlivé metody stanovení těchto látek.

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování 2-AFN s využitím moderních voltametrických technik. Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

1) Nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení stopových množství genotoxického 2-AFN pomocí visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) [2] a rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrody (m-AgSAE) s využitím technik DC voltametrie (DCV), diferenční pulsní voltametrie (DPV) a adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdSDPV).

2) Ověření praktické aplikovatelnosti nově vyvinutých voltametrických metod stanovení 2-AFN na modelových vzorcích pitné a říční vody.

3) Dosažení nižších hodnot L_Q stanovením 2-AFN pomocí akumulace látky na povrch HMDE s předřazenou extrakcí tuhou fází (SPE).

4) Provedení základních měření na nově zkonstruovaném miniaturizovaném systému elektrod ve 100 μ l objemu vzorku.

5) Zkoumání mechanismu redukce 2-AFN pomocí cyklické voltametrie (CV) na HMDE a m-AgSAE, srovnání mechanismu redukce 2-AFN a fluoren-9-onu (FN) a potvrzení počtu vyměňovaných elektronů při redukcí oxoskupiny coulometrií za konstantního potenciálu.

6) Porovnání nově vyvinutých voltametrických metod stanovení 2-AFN se stanovením 2-AFN pomocí fluorimetrie.

1.3 Studovaná látka

Studovanou látkou je 2-AFN. Jedná se o biologicky aktivní látku, která je nebezpečná lidskému zdraví a vykazuje genotoxické účinky [3]. 2-AFN je červenohnědý jemný prášek [4,5], ve vodě omezeně rozpustný, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, především v alkoholech a etherech [5,6]. 2-AFN obsahuje ve své struktuře oxo- a aminoskupinu, které mohou tvořit vodíkové vazby s protickými a některými aprotickými rozpouštědly [7]. Chemické, fyzikální a toxikologické vlastnosti nebyly doposud zcela prozkoumány. Látka je stabilní při skladování v důkladně uzavřené nádobce na suchém a dobře větraném místě [4].

C.A.S. Name: 2-Aminofluoren-9-one

C.A.S. Registry Number: 3096-57-9

Sumární vzorec: $C_{13}H_9NO$

Molekulová hmotnost: 195,22 g/mol

Bod tání: 157 – 160 °C

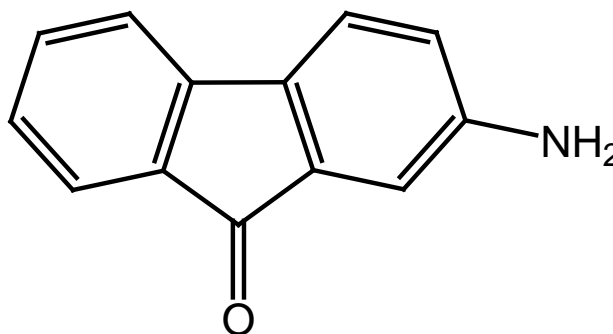
Bod varu: 426,4 °C

Bod vzplanutí: 211,7 °C

Hustota: 1,327 g/cm³

Index lomu: 1,72

Entalpie odpařování: 68,12 kJ/mol [6]



Obr. 1 Strukturní vzorec 2-AFN

1.4 Obecné vlastnosti oxo- a aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků

Deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) s oxoskupinou anebo aminoskupinou jsou dobře známé nebezpečné látky vyskytující se ve znečištěné vodě, atmosféře i půdě [8].

1.4.1 Oxoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Mezi oxoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (OPAU) patří aromatické ketony a chinony, které byly identifikovány v různých vzorcích životního prostředí [9]. Koncentrace OPAU v městských půdách jsou často vyšší než na venkově z důvodů hustoty obyvatelstva a vzdálenosti od zdroje znečištění (silnice, průmysl, odpady). Důležitý je tedy výzkum koncentrací, zdrojů a vertikální distribuce OPAU v půdě. Experimenty prokázaly, že OPAU jsou v půdě mobilnější než mateřské PAU kvůli vyšší rozpustnosti ve vodě, což může způsobit zvýšené znečištění podzemních vod [8,10]. Monitorováním vzduchu v městských oblastech bylo prokázáno, že atmosféra obsahuje významné množství OPAU, což je způsobeno zejména městskou antropogenní činností, jako je topení, automobilová doprava a průmyslová činnost [8]. Primárním zdrojem OPAU jsou spalovací procesy [8-10], především nedokonalé spalování uhlí a dalších fosilních paliv, dřeva a komunálního odpadu [11]. OPAU byly také zjištěny ve výfukových plynech, emisích a městském vzduchu [12]. Mohou také vznikat jako produkty reakcí PAU s ozonem v atmosféře [9] a jako rozkladné produkty PAU v bakteriálních procesech [13-15]. Sekundárními zdroji OPAU jsou tedy fotooxidace, chemické oxidace a mikrobiální transformační procesy [10]. Působením bakterií (např.

Mycobacterium ssp., *Pasteurella ssp.*), které mají vysoký biodegradační potenciál, jsou PAU se třemi a čtyřmi aromatickými jádry rozloženy na OPAU [14]. Některé OPAU patří mezi perzistentní organické látky, které dlouhodobě setrvávají v prostředí [8,10], a proto bioremediace nabízí možnost ničit různé kontaminanty životního prostředí pomocí přirozené biologické aktivity [15]. Langhehn a Steinhart označují aromatické ketony jako rozkladné produkty nafty a mazacích olejů, což představuje problém hromadění těchto oxidačních produktů v půdě [13]. Rychlejší a efektivnější odbourávání PAU je způsobeno zavedením silného okysličovadla do půdy. Reakcí peroxidu vodíku a železnatých iontů vznikají hydroxylové radikály, které patří mezi silné oxidanty (Fentonovo činidlo). Lundstedt zjistil, že použitím Fentonova činidla se PAU zoxidují na OPAU a tím dojde ke zlepšení degradace PAU v půdách [16].

OPAU působí svými nepříznivými účinky na volně žijící zvířata a lidské zdraví. Některé z nich vykazují akutní toxicitu, stejně jako potenciálně mutagenní a karcinogenní účinky [15]. Vzorky obsahující OPAU vykazují vyšší toxicitu vůči mikroorganismům a živočišným buňkám než mateřské PAU, jelikož působí přímo jako mutageny ve srovnání s PAU, které vyžadují pro projevení své toxicity aktivaci enzymů [8]. Mutagenní aktivita OPAU byla zkoumána pomocí bakterií rodu *Salmonella* [12]. OPAU mohou vyvolat předčasné stárnutí, rakovinu, chronické zánětlivé procesy a akutní respirační symptomy [11]. OPAU také mohou způsobit oxidační stres [8], při kterém dochází k nerovnováze mezi tvorbou reaktivního kyslíku (volných radikálů), který vzniká jako vedlejší produkt okysličování a látkové výměny, a schopností organismu rychle odbourávat a detoxikovat reaktivní meziprodukty. U lidí se podílí na mnoha nemocech, jako je například Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba, srdeční onemocnění, artritida nebo diabetes [17].

OPAU byly stanoveny v atmosféře velkých měst, v místech spalování či vedle vozovek [11], a to nejčastěji pomocí HPLC a GC-MS [12].

1.4.2 Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (APAU) jsou látky používané především v průmyslu při výrobě barviv [18,19], jako přísady do polymerních a pryžových směsí [18] nebo jako meziprodukty při výrobě průmyslových chemikálií (pesticidy, léky, povrchově aktivní látky), proto je lze nalézt v různých pracovních místech a v průmyslových odpadních vodách [18,20]. Byly identifikovány v surové ropě a ropných produktech po destilaci ropy [18]. Vyskytují se také v cigaretovém kouři, výfukových plynech automobilů [20] a různých potravinách v důsledku běžného tepelného zpracování pokrmů, jako je vaření,

smažení a grilování potravin bohatých na bílkoviny (např. maso) [21]. APAU jsou také hlavními metabolity nitroderivátů PAU (NPAU) v živých organismech [22,23]. Dalším zdrojem APAU je fotoredukce z NPAU v atmosféře obsahující nízkou koncentraci kyslíku a vysokou koncentraci vodíkových donorů (např. kouř ze dřeva) [18].

APAU se vyskytují v životním prostředí a je u nich prokázáno nebo existuje podezření z karcinogenity pro člověka [18,24,25]. APAU přítomné v tabákovém kouři reagují s DNA za vzniku jejich aduktů (např. s guaninem), což způsobuje genetické změny [26]. APAU lze chemicky převést na azidy, které nemají biologicky nebezpečné vlastnosti, ale při ozáření tvoří nitreny a ty reagují s DNA a mohou jí vážně poškodit [27]. N-acetylace je důležitou součástí metabolismu APAU, při které dochází k jejich detoxikaci pomocí N-acetyltransferázy [28].

Vzhledem k negativnímu vlivu APAU na živý organismus je prioritou jejich citlivé stanovení v různých environmentálních matricích [25]. APAU byly stanoveny metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí, kterou lze využít i pro stanovení NPAU, které nevykazují využitelnou fluorescenci, pokud jsou nejprve NPAU redukčně převedeny na APAU, které jsou většinou velmi fluorescentní [29]. Nejrozšířenějším detektorem pro HPLC analýzu APAU je UV detektor, ale lze využít i elektrochemického detektoru s uhlíkovou pastovou elektrodou [19,30], borem dopovanou diamantovou filmovou elektrodou [24,30] nebo platinovou elektrodou [30]. Mezi další chromatografické metody stanovení APAU patří GC-MS, LC-MS [30] či kapalinová elektroforéza s UV detekcí [25].

1.5 Vznik, výskyt, využití a vlastnosti derivátů fluorenu

1.5.1 Fluoren

Tato xenobiotická sloučenina a její deriváty jsou hlavními environmentálními hrozbami spojenými s ropou a ropnými skvrnami, spalovnami a průmyslovými odpadními vodami. Vzniká při spalování fosilních paliv, v ropných rafinériích a ve výfukových plynech automobilů [15]. Komerčně se získává z olejové frakce z černouhelného dehtu [31]. Je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v organických rozpouštědlech [15]. Fluoren se používá v metalurgii jako vhodný ligand v katalyzátorech, při tvorbě polyradikálů pro výrobu pryskyřic a při výrobě léků proti malárii a dalších farmaceutických výrobků [31]. Fluoren a jeho deriváty jsou základními materiály pro výrobu barviv a optických zjasňovacích systémů. Jsou používány v chemii tekutých krystalů, luminiscenční chemii, spektrofotometrické analýze, molekulární chemii a v chemii organokovových komplexů. Mezi jejich vlastnosti patří světelná a teplotní citlivost, tepelná odolnost, vodivost a odolnost proti korozi [15].

Fluoren byl použit jako základní jednotka pro získání např. spirofluorenu, terfluorenu, oligofluorenu a polyfluorenu, které se využívají v diodách, tranzistorech a fotovoltaiických člancích [32]. Polyfluoreny patří mezi konjugované polymery, jejichž velký význam spočívá ve schopnosti emitovat modré světlo s vysokou fotoluminiscenční účinností a dobrou fotostabilitou – tato schopnost se projevuje v širokém rozmezí fyzikálních (např. teplota) i chemických podmínek [33,34]. Fluoren tvoří jádro kopolymeru s oxidem křemičitým ve fluorescenčních nanočásticích, které jsou vhodné jako fluorescenční sondy pro bioanalýzu (imunitní a genetické testy), kvůli jejich nízké toxicitě [35]. U fluorenu nebyla prokázána mutagenita u bakterií (např. *Salmonella a Escherichia coli*) ani karcinogenita hepatocytů u potkanů [36].

1.5.2 Fluoren-9-on

Fluoren se snadno oxiduje na fluoren-9-on (FN), ale může dojít ještě k další oxidaci, a to již vzniklého FN na hydroxyfluoren-9-on [16]. K oxidaci fluorenu [37,38] dochází nejnázev v nejreaktivnější pozici 9 [31]. Vzniklý FN má žlutou barvu [37] a je známou fototoxickou látkou [39]. FN je mírným oxidačním činidlem a spolu s dalšími OPAU (např. 9,10-antrachinon, 1-indanon) byl stanoven v půdě, kde se FN vyskytoval ve vyšší koncentraci než jeho prekurzor fluoren, což mohlo souviset s vyšší koncentrací v emisích nebo rychlé transformaci PAU na OPAU v atmosféře [8]. George a Neufeld identifikovali FN jako degradační produkt fluorenu při působení houby *Phanerochaete chrysosporium* [13]. Fluoranthén je bakteriální degradací *Mycobacterium spp.* přeměněn na 9-fluoranthén-1-karboxylovou kyselinu, jejíž dekarboxylací rovněž vzniká FN [14]. FN a fluoren-9-ol byly identifikovány pomocí RP-HPLC jako metabolity degradace fluorenu působením houby *Agrocybe spp.* [15]. FN a alkylfluoren-9-ony jsou přítomny v motorové naftě, výfukových plynech vznětových motorů [23], v produktech pyrolýzy a rovněž tvoří složky petroleje a ropných asfaltů [40]. FN se používá v organických solárních člancích a zobrazovacích zařízeních [31]. Polyfluorenony jsou vhodné materiály pro ultratenké, lehké, pružné, barevné organické světelné diody (OLED) do elektronických zařízení nebo superkondenzátorů [41]. FN má karcinogenní a mutagenní potenciál [42].

1.5.3 2-Aminofluoren

2-Aminofluoren a 2-acetylaminofluoren patří mezi intenzivně studované látky z hlediska mutagenity a karcinogenity. Jejich interakce s DNA vytvořily základy genetického testování toxicity [20,26,43,44]. 2-Aminofluoren je méně nebezpečný než 2-acetylaminofluoren [26].

Tyto látky byly původně syntetizovány jako pesticidy, ale nikdy nebyly použity, protože testy toxicity ukázaly, že se jedná o silné karcinogeny hlavně pro játra, a tak se staly modelovými látkami pro studium mutagenních a karcinogenních účinků aromatických aminů [20,26]. 2-Aminofluoren a 2-acetylaminofluoren se oxidují cytochromem P450 na N-hydroxy-aminofluoren a N-hydroxy-N-acetylaminofluoren, které se kovalentně váží a poškozují DNA [45]. 2-Aminofluoren byl identifikován jako jeden z APAU odpovědných za vznik nádorů (např. prokázaný karcinom močového měchýře) [46,47]. Ústním podáním paclitaxelu, který je základem nové léčby rakoviny, je ovlivněna distribuce a metabolismus karcinogenního 2-aminofluorenu v různých tkáních u potkanů, ve kterých způsobuje především leukémii a nádory plic a mozku. 2-Aminofluoren a jeho metabolity byly stanoveny v moči a krvi pomocí HPLC-UV detekce [47]. Kuo se věnoval účinkům glukuronidu kvercetinu na N-acetylaci 2-aminofluorenu a počtem životaschopných buněk u lidí s leukémií [28]. Lin se zabýval vlivem kyseliny ellagové, která má protinádorové a antioxidační vlastnosti na metabolismus 2-aminofluorenu v mozkové tkáni potkanů [48].

V poslední době se 2-aminofluoren a podobné aromatické aminy začaly využívat jako fluorescenční sondy ke studiu vlastností micel [49,50], ve kterých je aminoskupina 2-aminofluorenu orientována směrem k polární oblasti a fluorenový zbytek směrem k nepolární části micel [50].

1.5.4 2-Aminofluoren-9-on

2-AFN je jedním z aminoderivátů FN, které se vyskytují v životním prostředí, a jeho výskyt je spojen se zpracováním a čištěním zemního plynu v plynových rafinériích; vzorky podzemních vod odebraných z těchto ekologicky zatížených míst často obsahují PAU a jejich deriváty [51,52]. Jedním z těchto derivátů je i 2-AFN, který byl stanoven pomocí LC-MS ve vodě z takto kontaminovaných lokalit [53]. 2-AFN a jemu strukturně podobné látky (2-amino-9-hydroxyfluoren, 2,4,7-trinitrofluoren-9-on, FN, 2,7-dinitrofluoren, 2-nitrofluoren, fluoren) byly spolu s emisemi oxidů dusíku, respirabilními částicemi a mnoha dalšími PAU nalezeny pomocí GC-MS a HPLC-UV ve výfukových plynech vznětových motorů [54]. V živých organismech byl 2-AFN nalezen jako jeden z metabolitů 2-nitrofluorenu [55-57] a byl identifikován pomocí LC-MS v moči potkanů, kterým byl 2-nitrofluoren podáván [58,59]. Obecně jsou aromatické aminy nebezpečné látky mající mutagenní a karcinogenní potenciál [30,46]. Genotoxický účinek 2-AFN jako metabolitu byl zkoumán *in vitro* s použitím ³²P ke značení DNA aduktů (při interakci vznikl komplex typu DNA – 2-AFN) [3]. Z 2-AFN lze připravit žlutý 2-azidofluoren-9-on-oxim, který se při ozáření světlem kovalentně váže

s DNA. Výzkum ukázal, že 2-azidofluoren-9-on-oxim v kvasinkách je mutagenní pouze při ozáření, zatímco neozářené buňky zůstaly nezměněny. Mutace u kvasinek různými dalšími deriváty fluorenu (acetylaminofluoren, 2,7-diaminofluoren a N-hydroxy-2-acetylaminofluoren) nebyla prokázána, ale N-acetoxy-2-acetylaminofluoren byl prokázán za mutagenní [27]. Fotooxidací 2-aminofluorenu vznikají mutageny působící na bakterii *Salmonella*. Mezi tyto mutageny patří 2-nitrosofluoren, 2-nitrofluoren, 2-nitrofluoren-9-on a 2-AFN [60]. Předpokládaná karcinogenita 2-AFN a některých strukturně podobných látek byla zkoumána pomocí testů cytotoxicity na hepatocytech v játrech potkanů. Positivní reakci poskytl 2-aminofluoren, který je známým hepatokarcinogenem, ale negativní reakci na karcinogenitu poskytl 2-nitrofluoren, 2-AFN, fluoren a anthracen [61]. V jiné studii byla u 2-AFN, 2-acetylaminofluorenu, 2,7-diacetamidofluorenu, 2,7-diaminofluorenu, 4-aminofluoren-9-onu i 2-aminofluorenu prokázána mutagenita u bakterií *Salmonella* a *Escherichia coli* a zároveň potvrzena karcinogenita hepatocytů u potkanů. U 9-aminofluorenu byla prokázána mutagenita pouze u bakterií [36].

2-AFN byl také použit jako amin pro přípravu Schiffových basí, které poskytují široké spektrum možností léčení a klinického využití, především jako protinádorové látky při léčbě nádorových onemocnění [62]. Fluorimetrické chování 2-AFN při interakci s β -cyklodextrinem, které je analogické k chování enzymů, bylo využito pro výrobu a použití 2-AFN jako fluorescenční sondy pro vyšetřování biologického prostředí [7].

I když bylo v minulosti použito několik analytických technik pro identifikaci 2-AFN [53,54], citlivá analytická metoda pro jeho stanovení, především pak v environmentálních vzorcích, nebyla dosud popsána. Vzhledem k tomu, že 2-AFN obsahuje ve své struktuře jak oxoskupinu, kterou lze elektrochemicky snadno redukovat, tak i aminoskupinu, kterou lze elektrochemicky snadno oxidovat, je možné pro stanovení jeho stopových množství použít moderní polarografické a voltametrické techniky [43,57,63,64].

1.6 Spektrometrické, separační a elektrochemické studium derivátů fluorenu

1.6.1 Spektrometrické metody výzkumu derivátů fluorenu

Pomocí fluorimetrie a cirkulárního dichroismu byly zkoumány komplexy β -cyklodextrinu a α -cyklodextrinu s FN, který tvoří komplexy v poměru 2:1 a 1:1. Vazba mezi FN a β -cyklodextrinem je složitější a spektrum naznačovalo, že FN je chráněn před interakcemi s molekulami vody dvěma molekulami β -cyklodextrinu [65]. Také byla provedena

spektrofluorimetrická studie, při které β -cyklodextrin tvořil komplexy s 2-aminofluorenem v poměru 1:1 a s 2-amino-9-hydroxyfluorenem v poměru 2:1; hydroxyskupina na pozici 9 může mít významnou roli v rozhodování o stechiometrii [66]. Pomocí fluorescenční spektroskopie byla popsána i molekulární interakce β -cyklodextrinu a 2-AFN, a to v poměru 1:1, při kterém je nesubstituovaná část 2-AFN zapouzdřena v hydrofobní dutině β -cyklodextrinu. Fluorescenční emisní spektrum 2-AFN ve vodě s různou koncentrací β -cyklodextrinu vykazuje dvě emisní maxima ($\lambda_{\max} = 354$ nm a $\lambda_{\max} = 474$ nm). Po spontánním začlenění 2-AFN do hydrofobní dutiny β -cyklodextrinu poklesne druhé maximum a zvýší se první maximum. Dále byla analyzována fluorescenční spektra 2-AFN v cyklohexanu, dioxanu, acetonitrilu a methanolu. V cyklohexanu bylo pozorováno jen jedno maximum ($\lambda_{\max} = 344$ nm), intenzita druhého maxima rostla v dalších rozpouštědlech s rostoucí polaritou rozpouštědla [7].

Luminiscenční vlastnosti aminofluoren-9-onu (1-amino-, 2-amino-, 3-amino- a 4-aminofluoren-9-onu) mají velký význam pro fotofyzikální výzkum. Jsou to vhodné modelové sloučeniny pro studium vlivu molekulární struktury a mezimolekulárních vodíkových vazeb [67-69]. Intramolekulární vodíková vazba vzniká propojením mezi N-H a karbonylovou skupinou, kterou díky své struktuře může tvořit pouze 1-aminofluoren-9-on [70,71]. Aminofluoren-9-ony vykazují specifické interakce s určitými rozpouštědly (vodíkové vazby s alkoholickými rozpouštědly) a byla prokázána i závislost fotofyzikálních vlastností na pozici aminoskupiny na aromatickém jádře [72]. Fotoredukce aromatických ketonů a jejich derivátů v přítomnosti vodíkových atomů je jedním z dobře prostudovaných základních procesů ve fotochemii [73]. Infračervená spektroskopie nepotvrdila specifické interakce mezi 3-aminofluoren-9-onu a rozpouštěnými ionty solí, ve kterých je aniontem chloristan a kationty Li^+ , Na^+ a Bu_4N^+ [74].

1.6.2 Separační metody využívané při stanovení derivátů fluorenu

Metodou LC-MS a HPLC-UV byly analyzovány deriváty fluorenu (oxo-, amino-, nitro-, hydroxyl-, acetylderiváty a příbuzné látky a metabolity 2-nitrofluorenu) [59]. Současné analytické metody stanovení FN se zaměřují především na analýzy vzorků ovzduší pomocí GC-MS techniky [42].

Aminofluoren-9-ony byly využity jako testovací látky při studiu rozlišení v HPLC-UV v závislosti na přítomnosti Cu^{2+} v kolonách. Kovové kationy byly používány v chromatografii pro dosažení selektivnější separace nedosažitelné bez kovů. V přítomnosti Cu^{2+} dochází k eluci derivátů fluorenu v pořadí: fluoren, fluoren-9-on, 4-aminofluoren-9-on, 2-aminofluoren-9-on, 2-aminofluoren, a 2-amino-9-hydroxyfluoren (bez přítomnosti Cu^{2+} v pořadí: fluoren, fluoren-9-on,

2-aminofluoren, 2-aminofluoren-9-on, 4-aminofluoren-9-on a 2-amino-9- hydroxylfluoren). Interakce mezi Cu^{2+} a 2-aminoizomerem je silnější než interakce s 4-aminoizomerem. S Cu^{2+} došlo k prodloužení času eluce a tím výraznějšímu oddělení píků jednotlivých derivátů fluorenu. Kunzru a Frei využili pro oddělení některých aromatických aminů Cd^{2+} [75].

1.6.3 Elektrochemické metody stanovení derivátů fluorenu

Redukce

Již v 50. letech minulého století se Ashworth zajímal o různé faktory, které ovlivňují mimo jiné i redukci FN. Na polohu a výšku vln mohou mít vliv koncentrace či druh kationtu v roztoku i jeho teplota [76]. Polarografická redukce FN byla studována také v roztocích o různých koncentracích ethanolu a při různých hodnotách pH [77]. FN byl redukován ve dvou krocích v rozmezí pH od 1,8 do 12,0 a byly pozorovány dvě vlny přibližně stejné výšky [78]. Za účelem vývoje citlivých elektrochemických metod stanovení FN byly pro studium jeho polarografického a voltametrického chování použity techniky DCTP (BR pufr o pH 10,0 – methanol (1:1), $L_Q \approx 3 \times 10^{-6}$ mol/l), DPP (BR pufr o pH 7,0 – methanol (1:1), $L_Q \approx 5 \times 10^{-7}$ mol/l) na DME, DPV (BR pufr o pH 3,0 – methanol (1:1), $L_Q \approx 2 \times 10^{-8}$ mol/l) na HMDE a DCV (BR pufr o pH 8,0 – methanol (1:1), $L_Q \approx 9 \times 10^{-7}$ mol/l) a DPV (BR pufr o pH 10,0 – methanol (1:1), $L_Q \approx 5 \times 10^{-7}$ mol/l) na m-AgSAE [42].

Při studiu vlivu amino-, hydroxylamino- a nitroskupin navázaných na FN na redukci oxoskupiny [79] byl 2-AFN rozpuštěn v acetonu a redukován v jediném dvouelektronovém kroku v prostředí aceton – citrátovo-fosfátový pufr o pH 1,3 až 12,0. Při pH 12,0 došlo k rozdělení polarografické vlny na dvě jednoelektronové vlny. Polarografické a voltametrické chování 2-AFN lze rovněž korelovat s elektrochemickou redukcí oxoskupiny samotného FN [57,76,77].

Na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze byly již elektrochemicky pomocí rtuťových a amalgamových elektrod [80] stanoveny deriváty fluorenu, jako je 2,7-dinitrofluoren, 2,7-dinitrofluoren-9-on [30,57], 2-nitrofluoren [56,57,63], 2-nitrofluoren-9-on [57,63] a FN [30]; tato stanovení byla založena na redukcí nitro- anebo oxoskupiny. Zkoumání interakce nitroderivátů fluorenu (2-nitrofluoren a 2,7-dinitrofluoren) s DNA bylo založeno na voltammetrické detekci, při které bylo poškození DNA sledováno pomocí DNA biosenzorů na bázi tištěných uhlíkových pastových elektrod (SPCPE) [55].

Oxidace

Pro snadno oxidovatelné APAU lze využít anodickou voltametrii na elektrodách založených na různých typech uhlíkových materiálů (skelný uhlík, uhlíková pasta) nebo borem dopované diamantové filmové elektrodě [30].

Jelikož 2-AFN, který doposud nebyl anodickou voltametrií stanovován, obsahuje i aminoskupinu, kterou lze oxidovat, jsou na tomto místě zmíněny příklady voltametrických oxidací aminoskupiny derivátů fluorenu. Voltametrické stanovení 2-aminofluorenu ($L_Q \approx 2 \times 10^{-7}$ mol/l) a 2,7-diaminofluorenu ($L_Q \approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) bylo provedeno na uhlíkové pastové elektrodě (citlivost stanovení byla zvýšena akumulací analytů na povrch elektrody) [43]. Elektrochemická polymerace 2-aminofluorenu byla vyšetřována pomocí elektrolýzy za konstantního potenciálu a cyklické voltametrie. Již dříve došlo k využití elektroaktivních polyfluorenů jako filmů na platinové a skelné uhlíkové elektrodě [81].

1.7 Pracovní elektrody

Pracovní elektroda rozhoduje o kvalitě celého systému a předurčuje parametry analytického stanovení (spektrum analytů, citlivost, přesnost, mez detekce a stanovitelnosti, robustnost, spolehlivost), ale i případné obtíže, zejména související s pasivací pracovní elektrody, ať už způsobené produkty elektrodové reakce nebo složkami analyzovaného roztoku [80,82].

Navzdory přehnaným obavám z toxicity kovové rtuti, které podstatně komplikují používání rtuťových elektrod, představuje HMDE jednu z nejlepších pracovních elektrod pro stanovení elektrochemicky redukovatelných látek vzhledem k atomicky hladkému povrchu, širokému potenciálovému oknu v katodické oblasti a zejména vzhledem ke snadné obnovitelnosti povrchu, což minimalizuje většinu problémů souvisejících s pasivací elektrody [82]. Problémem HMDE je především mechanická nestabilita komplikující její použití v průtokových metodách a při měřeních v terénu [80].

Amalgamové elektrody jsou netoxické, a tudíž přívětivé k životnímu prostředí, dostupné potenciálové okno je srovnatelné s HMDE a navíc jsou mechanicky robustní, a tedy i kompatibilní s měřením v proudících kapalinách [82]. Jejich příprava je velmi jednoduchá: naplněním skleněné trubičky práškovým stříbrem a ponořením přes noc do kapalné rtuti vznikne amalgam, který lze mechanicky vyleštit a připravit tak tzv. leštěnou stříbrnou pevnou amalgamovou elektrodu (p-AgSAE). Pro analytické účely se však lépe hodí rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda, kterou lze snadno připravit krátkým ponořením p-AgSAE do kapalné rtuti. Tato elektroda vykazuje nižší šum a lepší opakovatelnost signálu [80]. HMDE a m-AgSAE byly dále použity jako pracovní elektrody.

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovanou látkou byl 2-AFN (98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztok o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byl připraven navážením 0,0489 g 2-AFN a rozpuštěním v methanolu (99,9 %, p.a., Merck, Německo) v 250-ml odměrné baňce. Připravený zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty. Roztoky 2-AFN s nižšími koncentracemi byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem.

Brittonovy-Robinsonovy pufrы (BR pufrы) o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol/l hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu trihydrogenboritou (p.a., Lachema, Brno, ČR), trihydrogenfosforečnou (85 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a octovou (80 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR), každou o koncentraci 0,04 mol/l. Acetátový pufr o pH 4,0 byl připraven smísením 0,2 mol/l octové kyseliny a 0,2 mol/l hydroxidu sodného. Připravené pufrы byly uchovávány ve skleněných tmavých lahvích.

Pro porovnání mechanismu redukce oxoskupiny 2-AFN a FN technikou CV byl připraven roztok 2-AFN navážením 0,0098 g 2-AFN a rozpuštěním v N,N-dimethylformamidu (DMF; p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) v 50-ml odměrné baňce. Roztok FN (98% Sigma-Aldrich, Praha, ČR) byl připraven navážením 0,0090 g FN a rozpuštěním v DMF v 50-ml odměrné baňce. Zásobní roztoky měly koncentraci 1×10^{-3} mol/l.

Pro fluorimetrická měření byl připraven roztok 2-AFN o koncentraci 1×10^{-3} mol/l navážením 0,0098 g 2-AFN a rozpuštěním v methanolu (HPLC čistota, p.a., Merck, Německo) v 50-ml odměrné baňce.

Dalšími použitými chemikáliemi byly: chlorid draselný (p.a., Lachema, Brno, ČR), aceton (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a deionizovaná voda (produkovaná systémem Millipore Milli-Q Plus, Millipore, USA).

2.2 Aparatura

Při voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (oboje Polaro-Sensors, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní elektroda použita argentchloridová elektroda typu RAE 113 (Monokrystaly, Turnov, ČR; 1 mol/l KCl) a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda. Přehled použitých pracovních elektrod je uveden v kapitole 2.3.

Pro techniky DCV, DPV a AdSDPV byla použita rychlost polarizace 20 mV/s. Při pulsních technikách DPV a AdSDPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms) a modulační amplitudě –50 mV.

Coulometrie za konstantního potenciálu (CPC) byla měřena na přístroji μ Autolab typ III se softwarem GPES verze 4.9 (Eco Chemie, Nizozemí).

Fluorimetrická měření byla prováděna na přístroji Luminescence Spectrometer Aminco Bowman Series 2 (Thermo Electron Spectronic, USA), s ovládacím programem AB2 Luminescence Spectrometer verze 5.50, v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm (Hellma, SRN), za použití fotonásobiče o napětí 1000 V a s rychlostí skenu 3 nm/s.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou typu 924 005 (oboje Jenway, Velká Británie). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů.

2.3 Použité pracovní elektrody

2.3.1 Visící rtuťová kapková elektroda

Jednou z pracovních elektrod použitých při technikách DCV, DPV, AdSDPV a CV byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) typu UM μ Eč. ETP MME 00208 (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Pro vytvoření kapky byl ventil otevřen po dobu 450 ms. Povrch rtuťové kapky 1,42 mm² byl pro danou dobu otevření ventilu vypočítán z experimentálně zjištěné hmotnosti 20 kapek rtuti odkápnutých v prostředí 0,1 mol/l KCl při nulovém vloženém napětí proti používané argentchloridové referenční elektrodě; roztok KCl byl odlit a rtuť několikrát opláchnuta methanolem a vodou, osušena filtračním papírem a zvážena. Pro výpočet povrchu rtuti kapky byl předpokládán její kulový charakter. Průtoková rychlost rtuti 5,92 mg/s byla určena ponořením ústí kapiláry do předem zvážené nádoby s malým množstvím rtuti po dobu 30 s. Nádobka se rtutí byla znovu zvážena a z rozdílu hmotností byla vypočtena hmotnost rtuti prošlé kapilárou za 1 s.

2.3.2. Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda

Další pracovní elektrodou pro studium voltametrického chování 2-AFN při technikách DCV, DPV, AdSDPV a CV byla použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda (m-AgSAE) č. 2-05-18 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR) s průměrem amalgamového disku 0,52 mm, což odpovídá geometrické ploše 0,21 mm². Jako pracovní

elektroda v miniaturizovaném systému elektrod (kapitola 7) byla rovněž využita m-AgSAE s parametry: průměr amalgamového disku 0,95 mm a jeho geometrická plocha 0,71 mm².

Příprava m-AgSAE k měření byla prováděna podle postupu doporučeného v návodech k pracovní elektrodě [57], a to následujícími třemi operacemi, kterými byl obnovován povrch elektrody.

Při amalgamací byla elektroda ponořena do kapalně rtuti asi na 15 s, aby se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy asi po jednom týdnu nebo po dlouhodobém přerušení práce. Při každé amalgamací může vzniknout jinak velký meniskus, což může způsobit problémy v reprodukovatelnosti výsledků měření.

Elektrochemická aktivace byla prováděna v roztoku 0,2 mol/l KCl, který nebyl probubláván dusíkem, po dobu 300 s při vloženém napětí –2200 mV. Odstraněním adsorbovaných látek z povrchu elektrody dojde k elektrochemickému vyčištění povrchu elektrody. Elektrochemická aktivace byla prováděna po amalgamací, při pasivovaném povrchu elektrody a při přerušení práce po dobu delší než jednu hodinu.

Regenerace elektrody byla provedena vždy v měřeném roztoku před začátkem každého měření. Na elektrodu byl skokově vkládán kladnější potenciál $E_{\text{reg},1}$ a zápornější potenciál $E_{\text{reg},2}$ v intervalech 0,1 s po dobu 30 s. Hodnoty $E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ byly určeny experimentálně tak, aby bylo dosaženo co nejlepší opakovatelnosti výšky píků. Hodnoty vhodných regeneračních potenciálů se mohou lišit v závislosti na složení základního elektrolytu a stanovované látky. Hodnoty potenciálů $E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$, používané v případě studovaného 2-AFN, jsou pro jednotlivá pH uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Experimentálně nalezené optimální hodnoty regeneračních potenciálů pro m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9) pro jednotlivá pH použitého BR pufru.

pH	$E_{\text{reg},1}$ [mV]	$E_{\text{reg},2}$ [mV]	pH	$E_{\text{reg},1}$ [mV]	$E_{\text{reg},2}$ [mV]
2,0	0	–1100	8,0	–200	–1500
3,0	0	–1200	9,0	–200	–1600
4,0	0	–1200	10,0	–300	–1700
5,0	–100	–1300	11,0	–300	–1800
6,0	–100	–1300	12,0	–400	–1900
7,0	–200	–1400	13,1	–800	–1800

2.4 Pracovní postupy

Spektrofotometricky byla již v bakalářské práci provedena optimalizace složení vodně-methanolického prostředí a jako optimální bylo zvoleno prostředí methanol – BR pufr (1:9), ve kterém nedocházelo k vysrážení látky [1].

Pro měření voltametrického chování 2-AFN v závislosti na pH byl nejprve připraven BR pufr o určitém pH smícháním odpovídajících objemů zásadité a kyselé složky BR pufru. Do 10-ml odměrné baňky byl odpipetován 1,0 ml methanolického zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci 1×10^{-3} mol/l a doplněn BR puftrem o příslušném pH. Roztoky 2-AFN o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Před prvním voltametrickým měřením byl vzorek ve voltametrické nádobce probubláván dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) po dobu 5 min a před každým opakovaným měřením byl znovu probubláván alespoň po dobu 30 s. Před vstupem dusíku do voltametrické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném objemovém poměru jako v analyzovaném roztoku. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Voltametrické měření bylo opakováno třikrát na HMDE nebo pětkrát na m-AgSAE.

Modelové vzorky pitné či říční vody byly připraveny přidáním potřebného množství zásobního roztoku 2-AFN k dané matici. Z takto připravených vzorků bylo odebráno 9,0 ml a v 10-ml odměrné baňce doplněno 0,2 mol/l acetátovým puftrem o pH 4,0 (acetátový pufr byl použit na místo BR pufru o pH 4,0 pro zjednodušení).

Výška píku při DPV a AdSDPV byla měřena od spojnice minim po jeho stranách. Výška píku při DCV byla měřena jako vzdálenost přímky vzniklé prodloužením lineární části voltamogramu před píkem a maxima píku.

U kalibračních přímek byly sestrojeny konfidenční a predikční pásy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ [83]. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti opakovaných měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky (10σ) vydělený směrnici kalibrační přímky [84].

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. K výpočtům a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů Origin Pro verze 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

3. Voltametrické stanovení na visící rtuťové kapkové elektrodě

3.1 DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie

3.1.1 Vliv pH na voltametrické chování 2-aminofluoren-9-onu

Vliv pH na voltametrické chování 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) bylo sledováno technikou DCV a technikou DPV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9) v rozmezí pH použitého BR pufru 1,7 až 13,3.

Voltametrické křivky sudých hodnot pH BR pufru naměřené technikou DCV zobrazuje obr. 2, kde lze na voltametrických odezvách pozorovat v celém měřeném rozsahu pH jeden dobře vyvinutý pík, jehož potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám. V alkalickém prostředí (pH BR pufru 8,0 – 11,0) se objevuje druhý pík při negativnějších potenciálech než první pík a v prostředí pH BR pufru 12,0 a 13,3 je druhý pík ještě při negativnějších potenciálech než druhý pík v prostředí o nižším pH. Závislost potenciálu píku (E_p) na výsledném pH vodně-methanolickeho roztoku (pH^*) naměřená technikou DCV na HMDE je znázorněna na obr. 3. Metodou lineární regrese byly pro závislost E_p na pH^* roztoku získány tyto rovnice:

- a) první pík v rozmezí pH BR pufru 1,7 až 11,0,

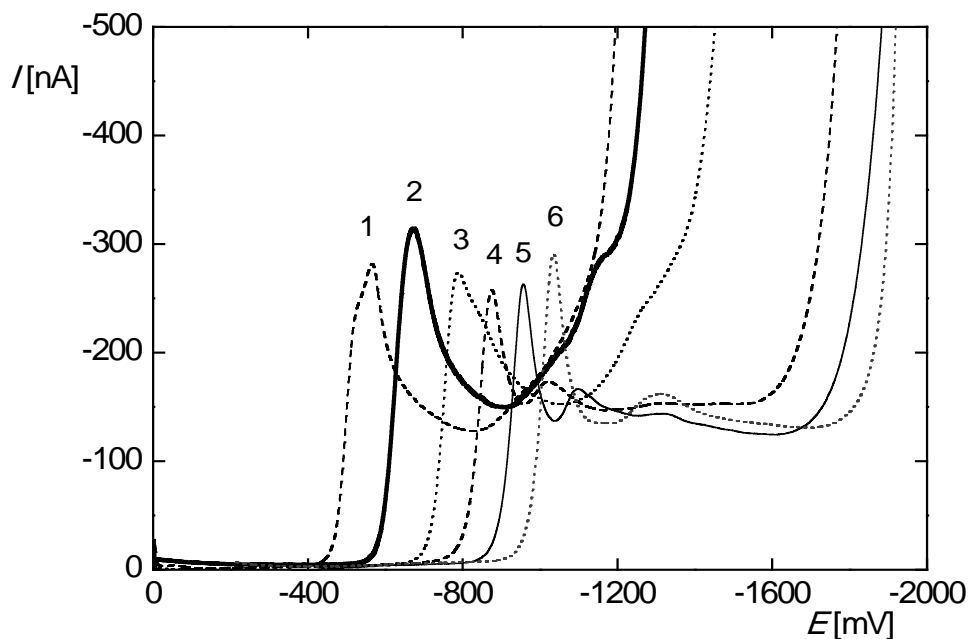
$$E_p^1 [\text{mV}] = -482,6 - 47,3 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9971)$$

- b) druhý pík v rozmezí pH BR pufru 8,0 až 11,0,

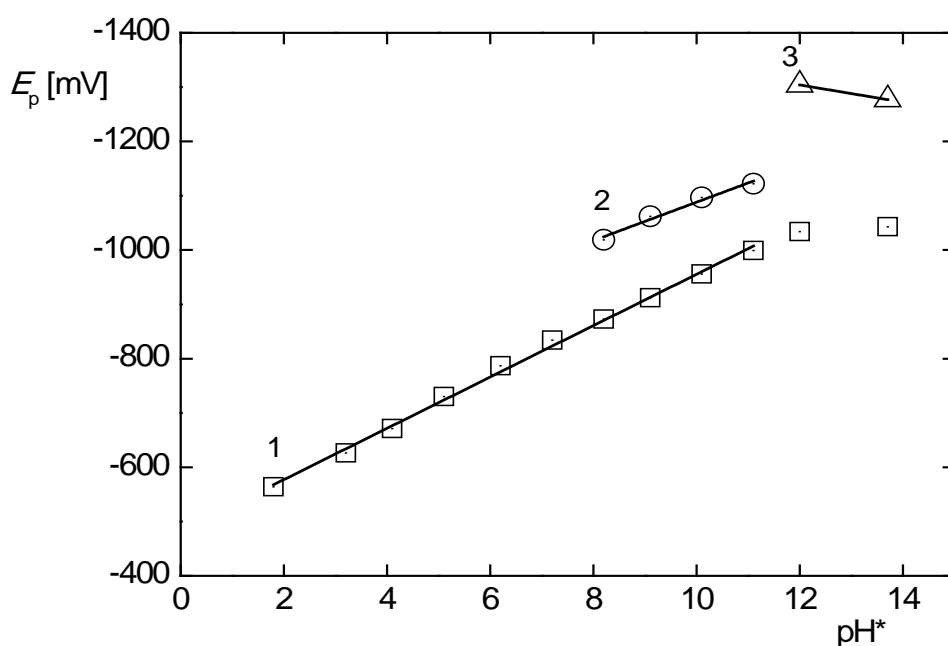
$$E_p^2 [\text{mV}] = -734,8 - 35,3 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9710).$$

- c) druhý pík v rozmezí pH BR pufru 12,0 až 13,3

$$E_p^2 [\text{mV}] = -1494,6 + 15,9 \text{ pH}^*$$



Obr. 2 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou DCV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru: 1,7 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí pro DCV stanovení 2-AFN je zaznačen tlustou čarou.



Obr. 3 Závislost potenciálu pík 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na výsledném pH roztoku (pH^*) měřena technikou DCV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9): první pík v rozmezí pH BR pufru 1,7 až 11,0 (1); druhý pík v rozmezí pH BR pufru 8,0 až 11,0 (2) a druhý pík v rozmezí pH BR pufru 12,0 až 13,3 (3).

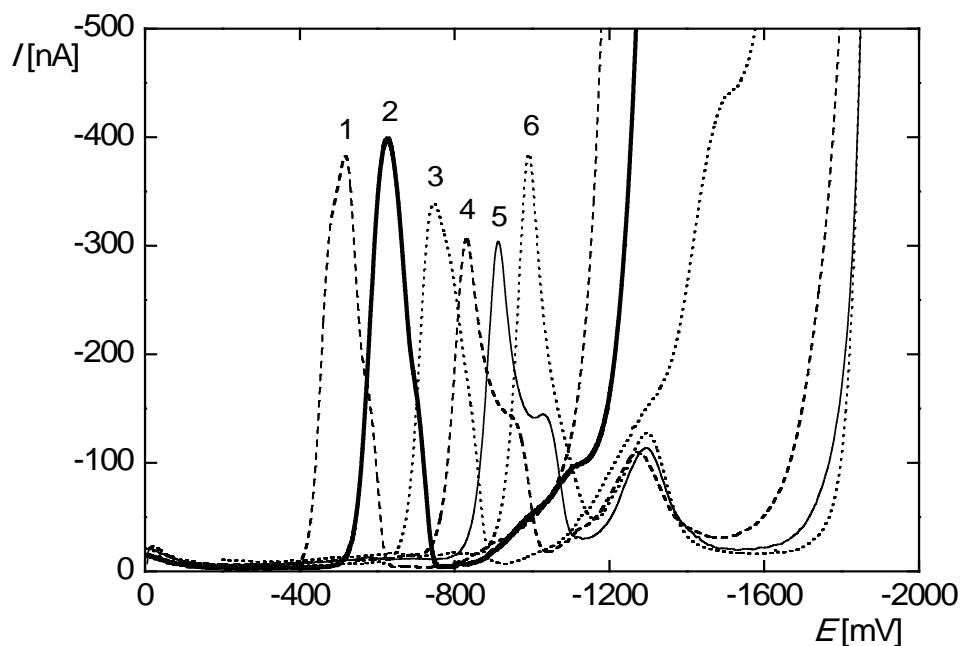
Technikou DPV byly naměřeny voltametrické křivky sudých hodnot pH BR pufru (obr. 4), které ukazují opět jeden dobře vyvinutý pík, jehož potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám potenciálu. Druhý pík se objevuje v alkalickém prostředí (pH BR pufru 7,0 – 13,3) při negativnějším potenciálu než první pík. Závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolickeho roztoku (pH^*) technikou DPV na HMDE je znázorněna na obr. 5. Metodou lineární regrese byly pro závislost E_p na pH^* roztoku získány tyto rovnice:

a) první pík v rozmezí pH BR pufru 1,7 až 12,0,

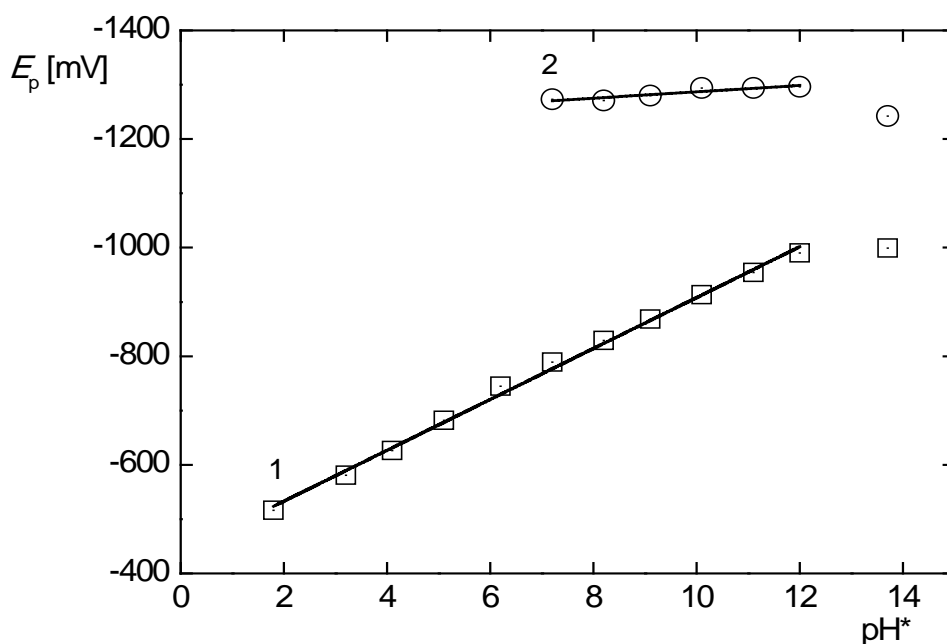
$$E_p^1 [\text{mV}] = -439,2 - 46,9 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9966)$$

b) druhý pík v rozmezí pH BR pufru 7,0 až 12,0,

$$E_p^2 [\text{mV}] = -1228,17 - 5,87 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,8314).$$



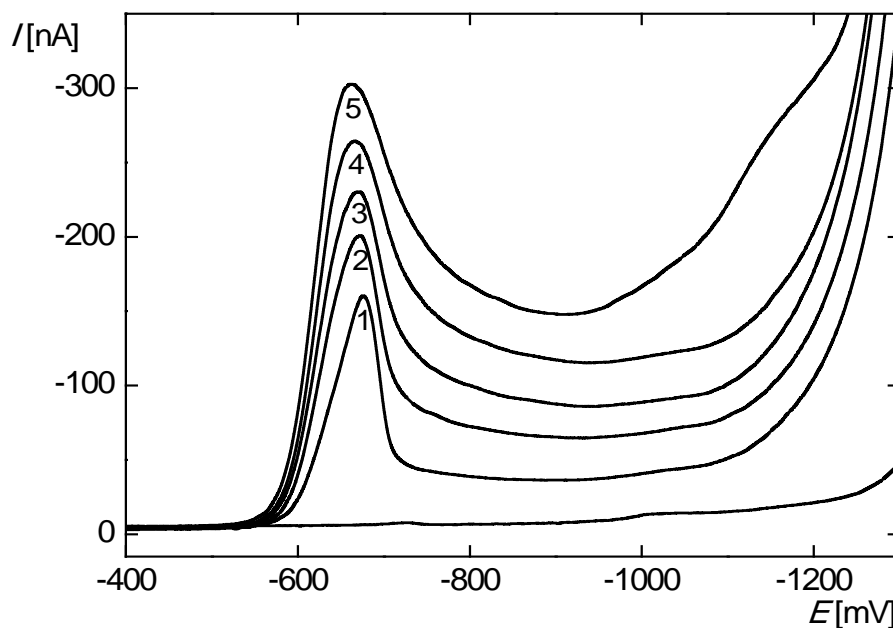
Obr. 4 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru: 1,7 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí pro DPV stanovení 2-AFN je označen tlustou čarou.



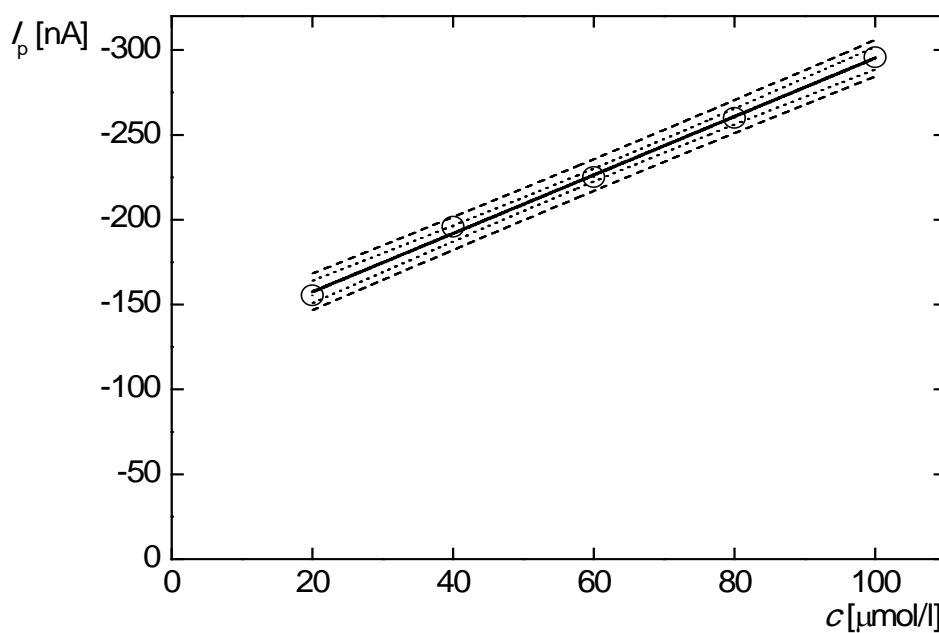
Obr. 5 Závislost potenciálu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na výsledném pH roztoku (pH^*) měřena technikou DPV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9): první pík v rozmezí pH BR pufru 1,7 až 12,0 (1) a druhý pík v rozmezí pH BR pufru 7,0 až 12,0 (2).

3.1.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu

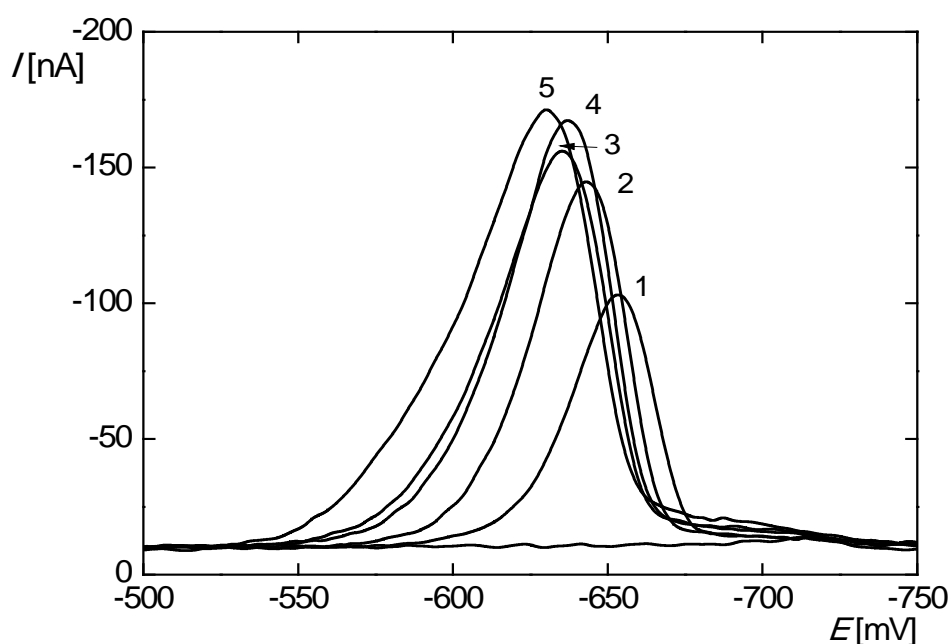
Pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno optimální prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) pro techniku DCV i DPV. V tomto prostředí 2-AFN poskytoval nejsymetrickější, nejlépe vyvinutý a jeden z nejvyšších píků. Technikou DCV i DPV bylo naměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-4} mol/l. 2-AFN se choval při použití obou technik obdobně; v rozmezí koncentrací 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l je absolutní hodnota úseku regresní rovnice mnohem vyšší než 0 (pro techniku DCV (obr. 6), s příslušnou kalibrační závislostí zobrazenou na obr. 7). Kalibrační závislost 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l není lineární, ale lze jí proložit polynomem druhého stupně (pro techniku DPV (obr. 8), s příslušnou kalibrační závislostí zobrazenou na obr. 9). Koncentrační závislosti bylo možné proměřit i v rozmezí koncentrací 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol/l. Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) technikou DCV i DPV jsou uvedeny v tabulce 2.



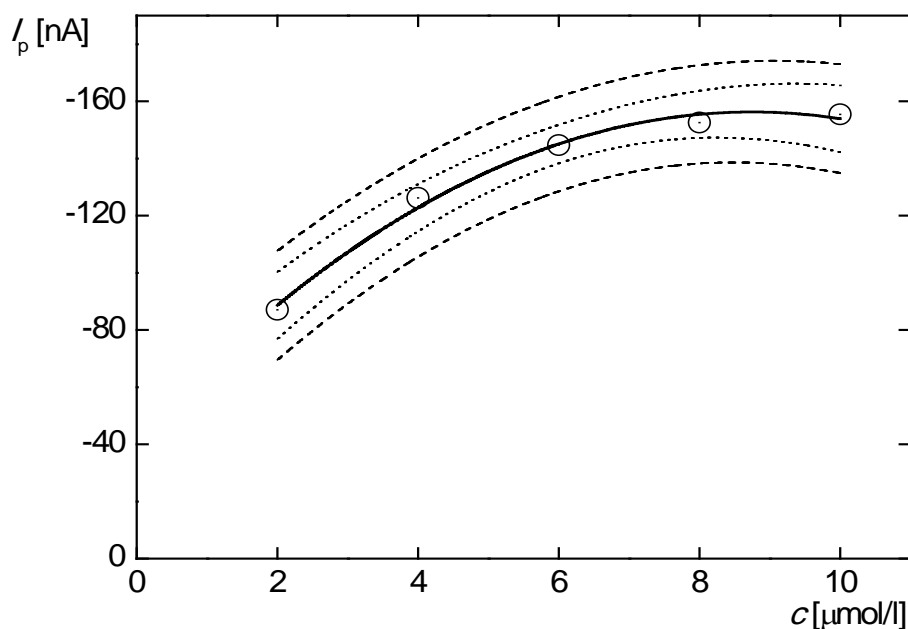
Obr. 6 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou DCV na HMDE v rozmezí koncentrací 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 2×10^{-5} (1); 4×10^{-5} (2); 6×10^{-5} (3); 8×10^{-5} (4); 1×10^{-4} (5).



Obr. 7 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena technikou DCV na HMDE v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Predikční (— — —) a konfidenční pásy (·····) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 8 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 2×10^{-6} (1); 4×10^{-6} (2); 6×10^{-6} (3); 8×10^{-6} (4); 1×10^{-5} (5).



Obr. 9 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena technikou DPV na HMDE v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Predikční (— — —) a konfidenční pásy (·····) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 2

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN technikou DCV a DPV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9).

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
DCV				
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-1,723 \pm 0,042$	$-123,1 \pm 2,8$	0,9976	—
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	— ^{b,d}	— ^{b,d}	— ^{b,d}	—
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-34,4 \pm 1,1$	$-0,29 \pm 0,65^c$	0,9951	2×10^{-7}
DPV				
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-2,068 \pm 0,061$	$-169,3 \pm 4,0$	0,9966	—
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	— ^{b,e}	— ^{b,e}	— ^{b,e}	—
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-47,3 \pm 1,2$	$0,72 \pm 0,75^c$	0,9966	1×10^{-7}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^b – závislost není lineární, ^c – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, ^d – I_p [nA] = $(0,77 \pm 0,12)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-16,2 \pm 1,4)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + $(-39,6 \pm 3,7)$, $R^2 = 0,9942$, ^e – I_p [nA] = $(1,54 \pm 0,44)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-26,2 \pm 5,3)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + (-44 ± 14) , $R^2 = 0,9846$.

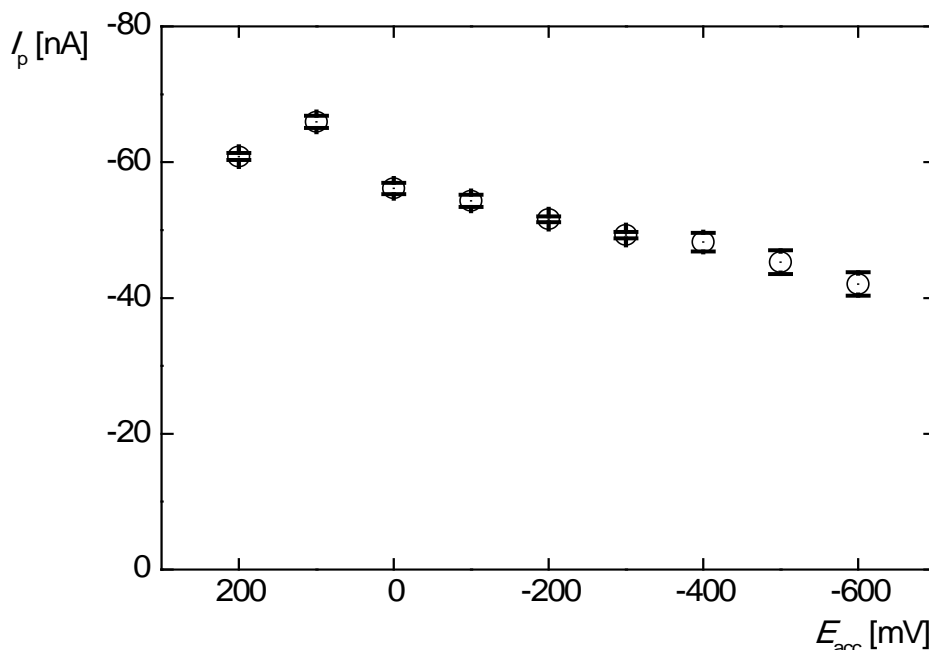
3.2 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie

3.2.1 Optimalizace podmínek pro voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu

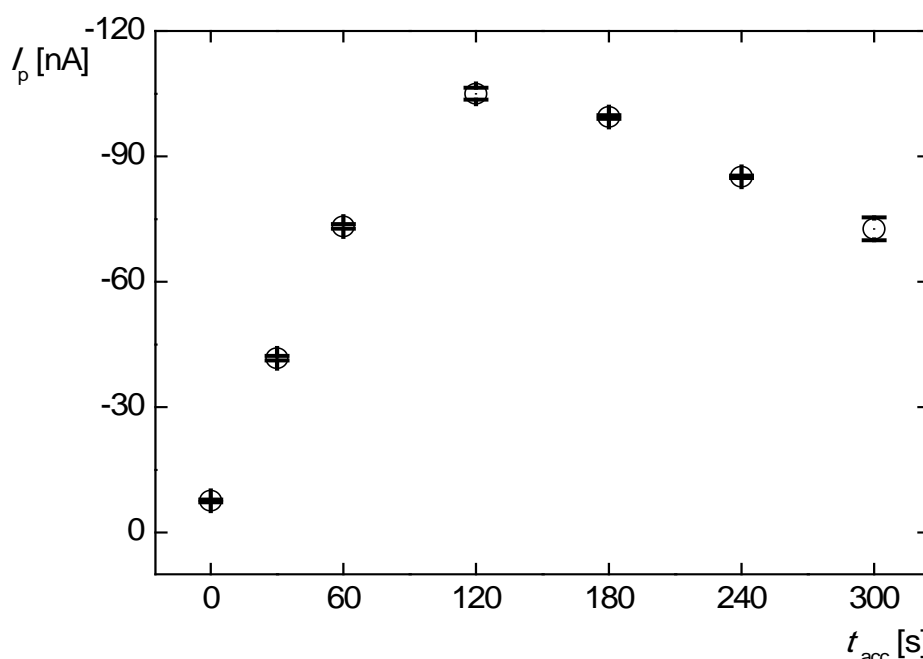
Ve snaze dosáhnout nižší meze stanovitelnosti než metodou DPV na HMDE ($L_Q \approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) bylo využito akumulace 2-AFN na elektrodu a jeho chování tedy sledováno metodou AdSDPV na HMDE. Již dříve bylo zjištěno, že přítomnost methanolu v měřeném roztoku snižuje adsorpci zkoumané látky na povrch HMDE [63,85]. Z tohoto důvodu bylo stanovení 2-AFN pomocí AdSDPV prováděno v nepřítomnosti methanolu, kdy při takto malých koncentracích 2-AFN nebyl problém s rozpustností látky.

V prostředích BR pufru o pH 2,0 a 4,0 a acetátového pufru o pH 4,0 byla nejprve změřena odezva 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) při době akumulace (t_{acc}) 0 s a vyhodnocen potenciál píku (E_p). Dále bylo pracováno při $t_{\text{acc}} = 60$ s, potenciál akumulace (E_{acc}) byl postupně měněn od +200 mV po stovkách mV až po hodnotu rovnou E_p a při každé hodnotě E_{acc} byly zaznamenány příslušné AdSDP voltamogramy. Pro další měření bylo vybráno prostředí acetátového pufru o pH 4,0, ve kterém výška signálu (I_p) 2-AFN byla nejvyšší. Závislost I_p na

E_{acc} je znázorněna na obr 10. Jako optimální hodnota E_{acc} byla vybrána hodnota +100 mV. Závislost I_p na t_{acc} při $E_{acc} = +100$ mV je zobrazena na obr. 11. Optimální t_{acc} byla zvolena 120 s, při této hodnotě t_{acc} byl pík 2-AFN dostatečně vyvinutý a další prodlužování doby akumulace již bylo z praktického hlediska neúčelné.



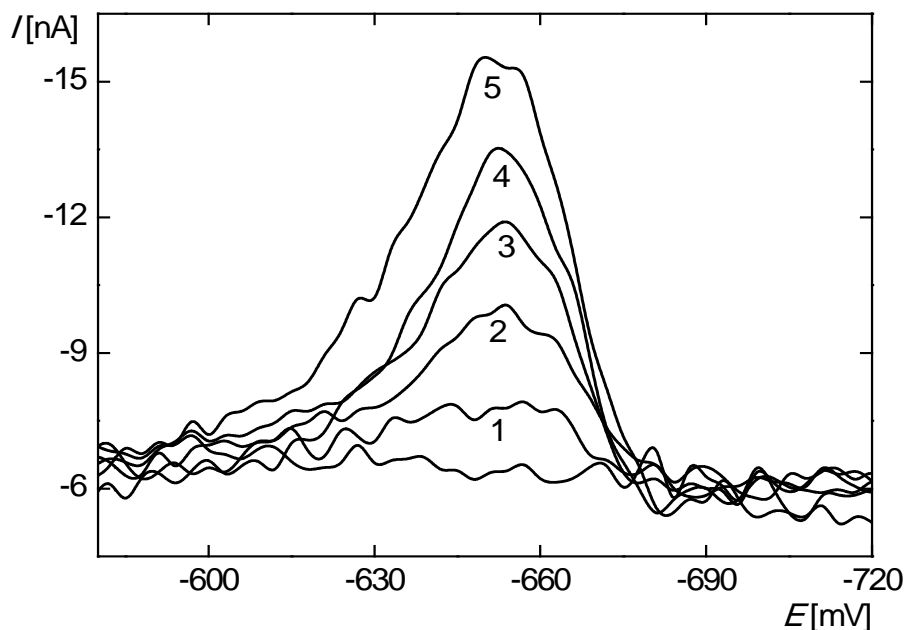
Obr. 10 Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) na potenciálu akumulace měřena technikou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $t_{acc} = 60$ s.



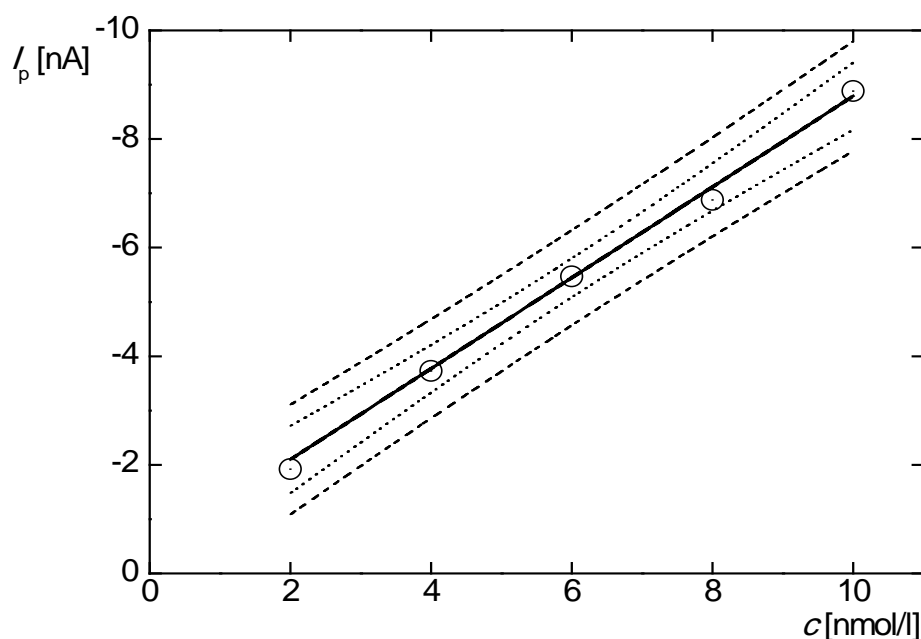
Obr. 11 Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) na době akumulace měřena technikou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při potenciálu akumulace $E_{acc} = +100$ mV.

3.2.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu

Pro měření koncentračních závislostí technikou AdSDPV na HMDE bylo vybráno prostředí acetátového pufru o pH 4,0 a při optimálních podmínkách akumulace $t_{acc} = 120$ s a $E_{acc} = +100$ mV byly proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí 2×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l a v rozmezí 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l (obr. 12) s kalibrační závislostí zobrazenou na obr. 13. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce 3.



Obr. 12 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou AdSDPV na HMDE v koncentračním rozmezí 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 2×10^{-9} (1); 4×10^{-9} (2); 6×10^{-9} (3); 8×10^{-9} (4); 1×10^{-8} (5).



Obr. 13 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena technikou AdSDPV na HMDE v koncentračním rozmezí 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Predikční (---) a konfidenční pásy (·····) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 3

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN technikou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
2×10^{-8} až 1×10^{-7}	-898 ± 22	$-0,9 \pm 1,4^b$	0,9977	—
2×10^{-9} až 1×10^{-8}	-859 ± 26	$-0,35 \pm 0,86^b$	0,9910	4×10^{-9}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^b – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

4. Voltametrické stanovení na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě

4.1 DC voltametrie a diferenční pulsní voltametrie

4.1.1 Vliv pH na voltametrické chování 2-aminofluoren-9-onu

Voltametrické chování 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) bylo sledováno technikou DCV a DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9) v rozmezí pH použitého BR pufru 2,0 až 13,1 při vhodných regeneračních potenciálech (tabulka 1, kapitola 2.3.2).

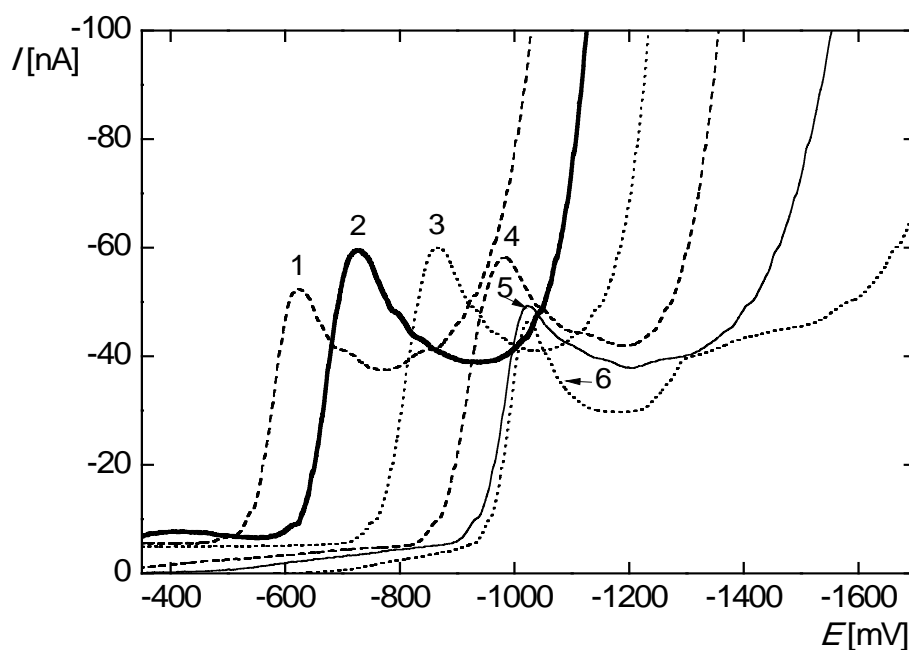
Naměřené voltametrické křivky 2-AFN získané v prostředích o sudých hodnotách pH BR pufru technikou DCV na m-AgSAE zobrazuje obr. 14, kde lze pozorovat jeden dobře vyvinutý voltametrický pík, který dosahuje v celém rozmezí hodnot pH přibližně stejné výšky a jehož potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám až do pH BR pufru 9,0. V alkalickém prostředí (pH BR pufru 9,0 – 13,1) se potenciál píku již se zvyšujícím se pH neposouvá. Závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolického roztoku (pH^*) naměřena technikou DCV je znázorněna na obr. 15. Metodou lineární regrese byly pro závislost E_p na pH^* roztoku technikou DCV na m-AgSAE získány tyto rovnice:

a) první pík v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 9,0,

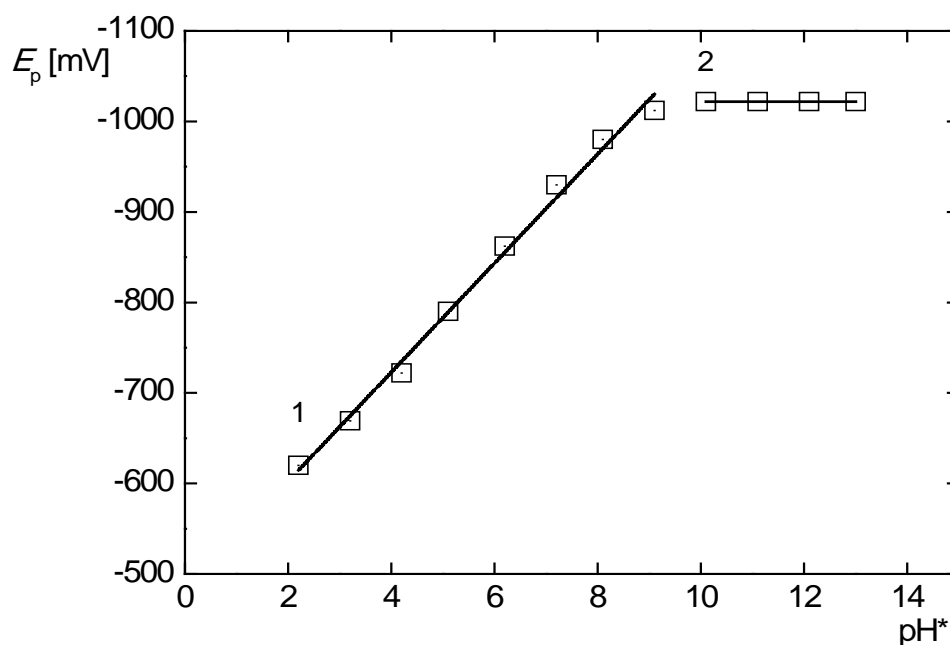
$$E_p^1 [\text{mV}] = -481,8 - 60,3 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9929)$$

b) první pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 13,1,

$$E_p^1 [\text{mV}] = -1022,0 + 7,1 \times 10^{-14} \text{ pH}^* \quad (R^2 = 1,0000).$$



Obr. 14 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou DCV s regenerací (tabulka 1, kapitola 2.3.2) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí pro DCV stanovení 2-AFN je zaznačen tlustou čarou.



Obr. 15 Závislost potenciálu pík 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na výsledném pH roztoku (pH^*) měřena technikou DCV s regenerací (tabulka 1, kapitola 2.3.2) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9): první pík v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 9,0 (1) a první pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 13,1 (2).

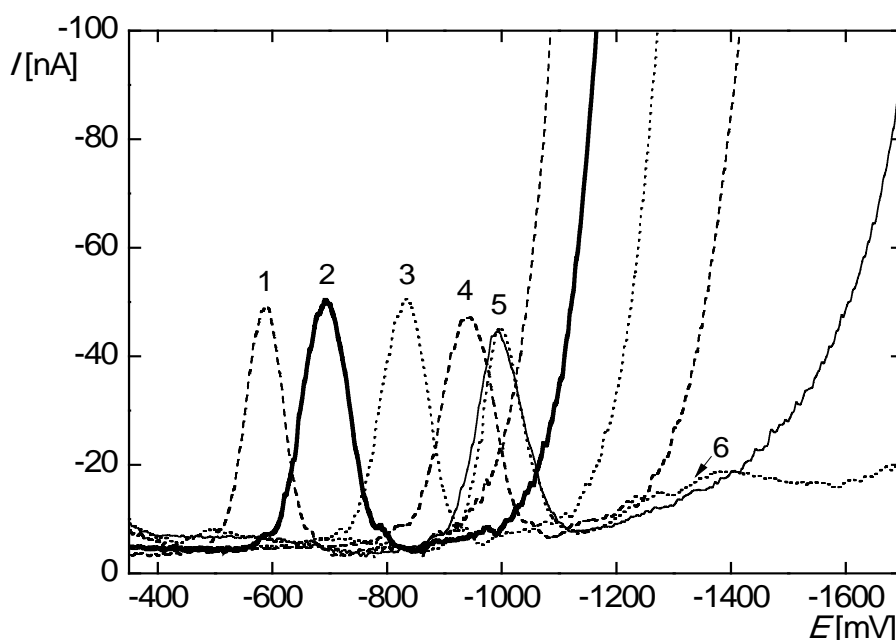
Sudé hodnoty pH BR pufru naměřených voltametrických křivek 2-AFN technikou DPV na m-AgSAE jsou zobrazeny obr. 16. Na voltametrických odezvách lze pozorovat stejné chování jako při měření technikou DCV, tedy jeden dobře vyvinutý pík přibližně stejné výšky, jehož potenciál se posouvá s rostoucím pH k negativnějším hodnotám potenciálu. V rozmezí pH BR pufru 9,0 – 13,1 se potenciál píku již neposouvá. Závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolickeho roztoku (pH^*) je znázorněna na obr. 17. Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu píku na pH^* roztoku získány tyto rovnice:

a) první pík v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 9,0,

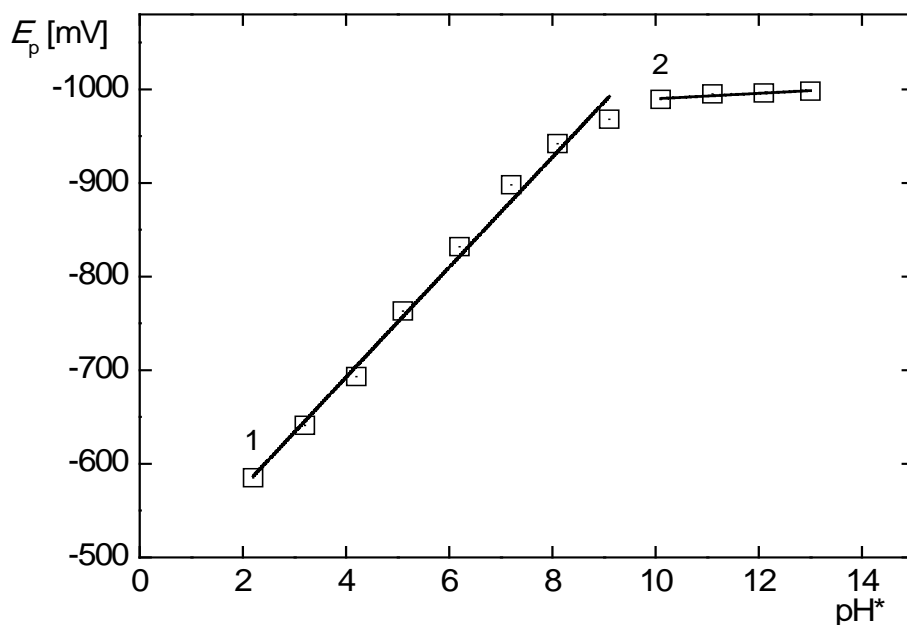
$$E_p^1 [\text{mV}] = -457,5 - 58,8 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9898)$$

b) první pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 13,1,

$$E_p^1 [\text{mV}] = -960,9 - 2,9 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,8193).$$

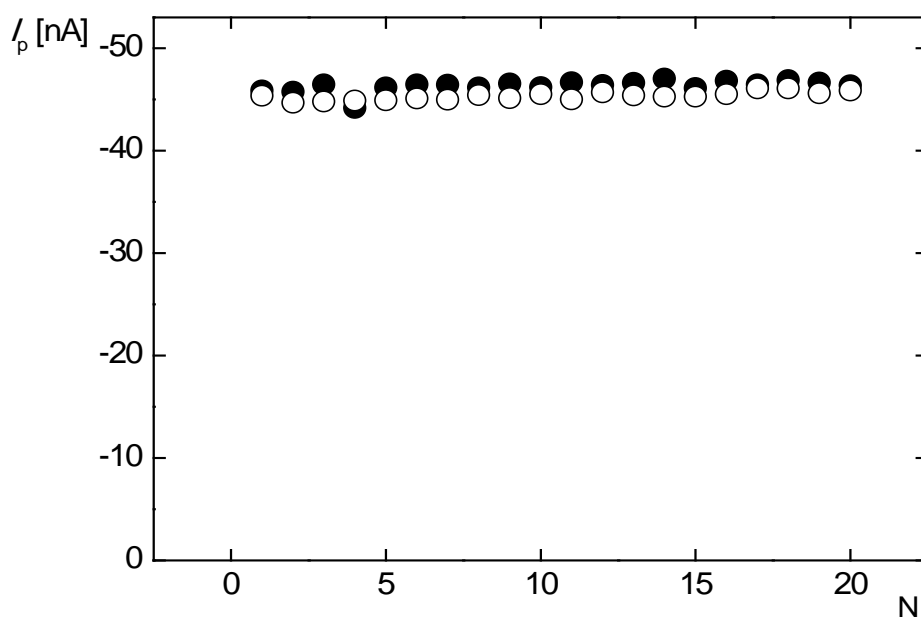


Obr. 16 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) měřené technikou DPV s regenerací (tabulka 1, kapitola 2.3.2) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí pro DPV stanovení 2-AFN je zaznačen tlustou čarou.



Obr. 17 Závislost potenciálu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na výsledném pH roztoku (pH^*) měřena technikou DPV s regenerací (tabulka 1, kapitola 2.3.2) na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9): první pík v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 9,0 (1) a první pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 13,1 (2).

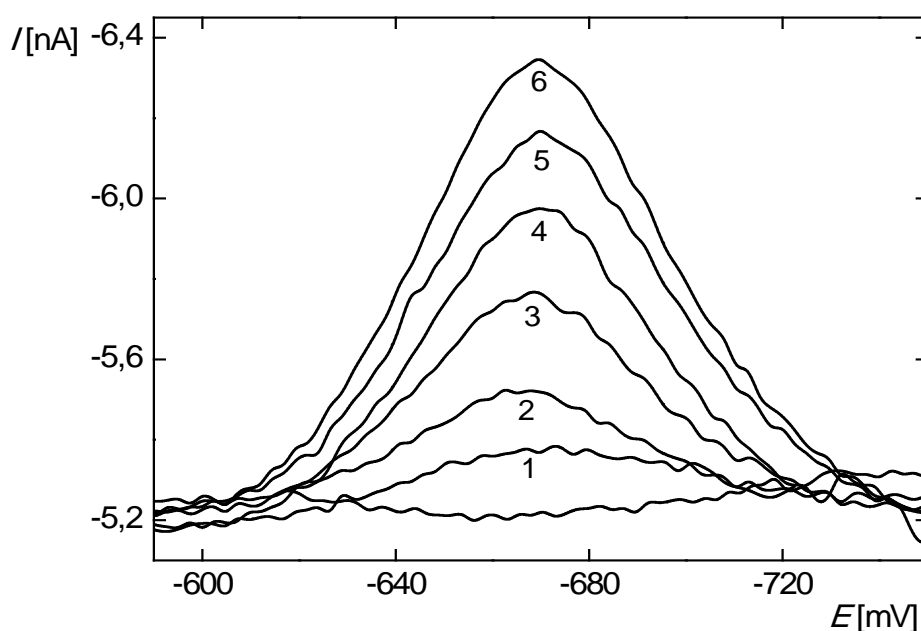
Jako vhodné prostředí pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Následně bylo měřeno 20 opakovaných stanovení bez regenerací a s regeneracemi ($E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV). Pro techniku DPV je závislost zobrazena na obr. 18. Z výsledků byla spočítána relativní směrodatná odchylka s_r , a tím zjištěna opakovatelnost výšky signálu jednoho roztoku 2-AFN na m-AgSAE. Při měření bez regenerace byla s_r výšky píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřeného technikou DCV 0,6 % a při použití regeneračních potenciálů $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV 0,5%. Při měření technikou DPV byla hodnota s_r bez regenerace 1,0 % a při použití regeneračních potenciálů $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV 0,9%. Jelikož hodnota s_r byla nižší než 1,0%, byla opakovatelnost měření velmi dobrá a nebylo nutné hledat jiné vhodné kombinace regeneračních potenciálů.



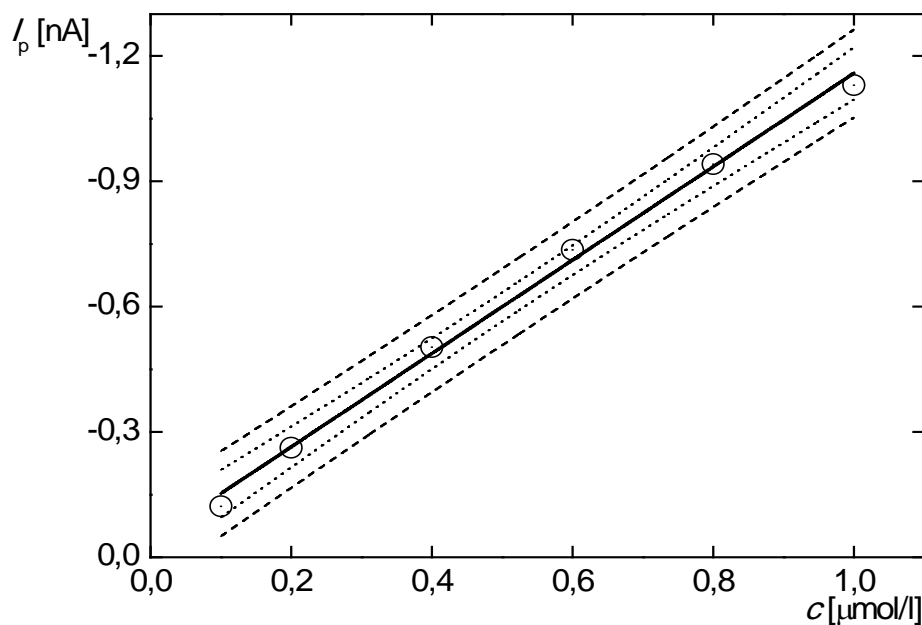
Obr. 18 Závislost výšky píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na počtu měření technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9): měření s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV (○) a měření bez regenerace (●).

4.1.2 Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu

Optimální prostředí pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) s regeneračními potenciály $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV. Pík při tomto pH byl nejsymetričtější, nejlépe vyvinutý a jeden z nejvyšších. Technikou DCV i technikou DPV bylo proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-4} mol/l. V celém měřeném koncentračním rozmezí byly u obou technik kalibrační závislosti lineární a jejich parametry jsou uvedeny v tabulce 4. Na obr. 19 jsou zobrazeny DP voltamogramy koncentračního rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol/l a kalibrační závislost je zobrazena na obr. 20.



Obr. 19 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou DPV na m-AgSAE s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v rozmezí koncentrací 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 1×10^{-7} (1); 2×10^{-7} (2); 4×10^{-7} (3); 6×10^{-7} (4); 8×10^{-7} (5); 1×10^{-6} (6).



Obr. 20 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena technikou DPV na m-AgSAE v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 4

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN technikou DCV a DPV na m-AgSAE s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9).

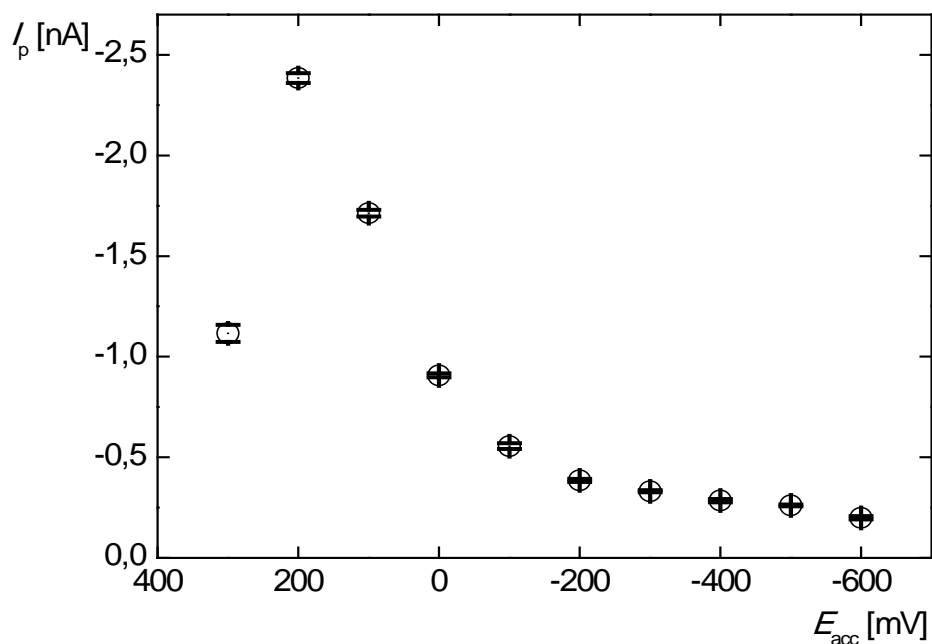
Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
DCV				
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-0,5225 \pm 0,0059$	$-4,78 \pm 0,39$	0,9995	–
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,714 \pm 0,015$	$0,095 \pm 0,097^b$	0,9983	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,369 \pm 0,033$	$0,097 \pm 0,022$	0,9977	2×10^{-7}
DPV				
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-0,4435 \pm 0,0082$	$-4,92 \pm 0,54$	0,9987	–
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,764 \pm 0,018$	$-0,29 \pm 0,12^b$	0,9979	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,118 \pm 0,039$	$-0,041 \pm 0,024^b$	0,9939	1×10^{-7}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^b – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

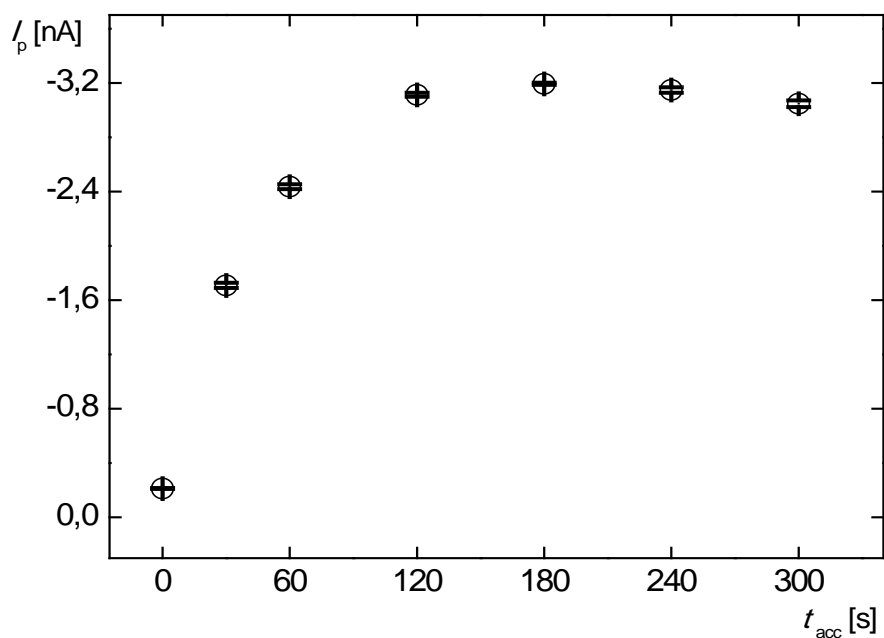
4.2 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie

4.2.1 Optimalizace podmínek pro voltametrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu

Voltametrické chování 2-AFN s cílem dosáhnout nižší meze stanovitelnosti než metodou DPV na m-AgSAE ($L_Q \approx 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) bylo sledováno také technikou AdSDPV na m-AgSAE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0, stejně jak o u HMDE. Pro regeneraci m-AgSAE byly použity potenciály $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$, stejně jako u techniky DCV a DPV. Postup optimalizace byl stejný jako u HMDE (kapitola 3.2.1). Jako optimální hodnota potenciálu akumulace (E_{acc}) byla vybrána hodnota +200 mV (obr. 21) a doba akumulace (t_{acc}) 180 s (obr. 22).



Obr. 21 Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) na potenciálu akumulace měřena technikou AdSDPV na $m\text{-AgSAE}$ s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí acetátového pufru o $\text{pH } 4,0$ při době akumulace $t_{acc} = 60 \text{ s}$.



Obr. 22 Závislost proudu píku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) na době akumulace měřena technikou AdSDPV na $m\text{-AgSAE}$ s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí acetátového pufru o $\text{pH } 4,0$ při potenciálu akumulace $E_{acc} = +200 \text{ mV}$.

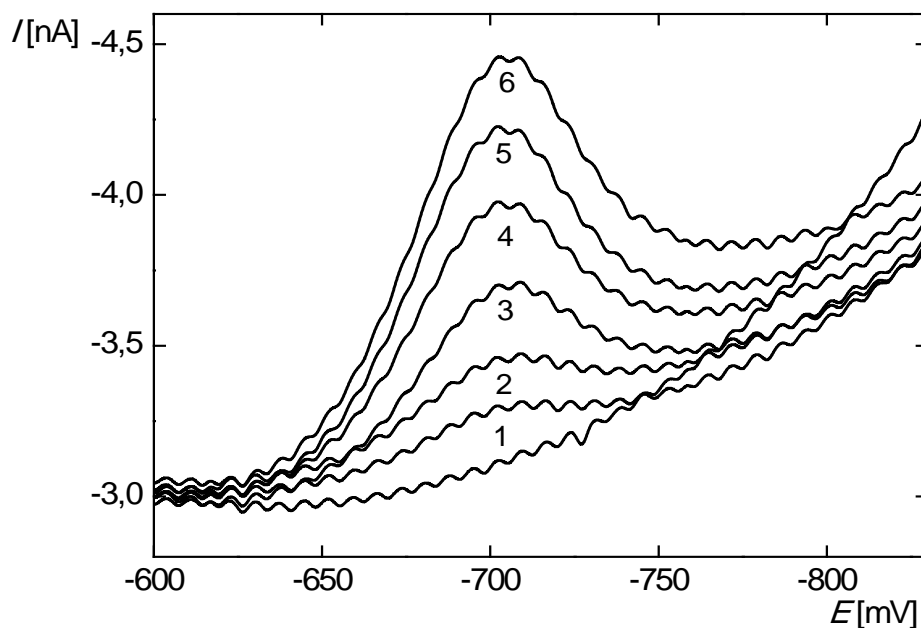
4.2.2 Koncentrační závislost voltametrické odezvy 2-aminofluoren-9-onu

Pro měření koncentračních závislostí technikou AdSDPV na m-AgSAE s regeneračními potenciály $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV bylo vybráno prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Při optimálních podmínkách $t_{\text{acc}} = 180$ s a $E_{\text{acc}} = +200$ mV bylo proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l, ve kterém kalibrační závislost není lineární. Při pokusu o získání lineární koncentrační závislosti bylo zkoumáno zkrácení t_{acc} i změna E_{acc} . Při všech změněných podmínkách však byly získány rovněž nelineární koncentrační závislosti, navíc s nižší směrnici. Adsorpci 2-AFN na povrch m-AgSAE lze úspěšně využít, avšak pouze za předpokladu, že by koncentrační závislost byla popsána nelineární regresní funkcí. Pro prostředí acetátového pufru o pH 4,0 byla získána rovnice: $I_p [\text{nA}] = (349 \pm 31)c^2 [\mu\text{mol}^2/\text{l}^2] + (-68,1 \pm 3,4)c [\mu\text{mol}/\text{l}] + (0,124 \pm 0,075)$, $R^2 = 0,9970$, ($L_Q \approx 1 \times 10^{-8}$ mol/l, $t_{\text{acc}} = 180$ s a $E_{\text{acc}} = +200$ mV).

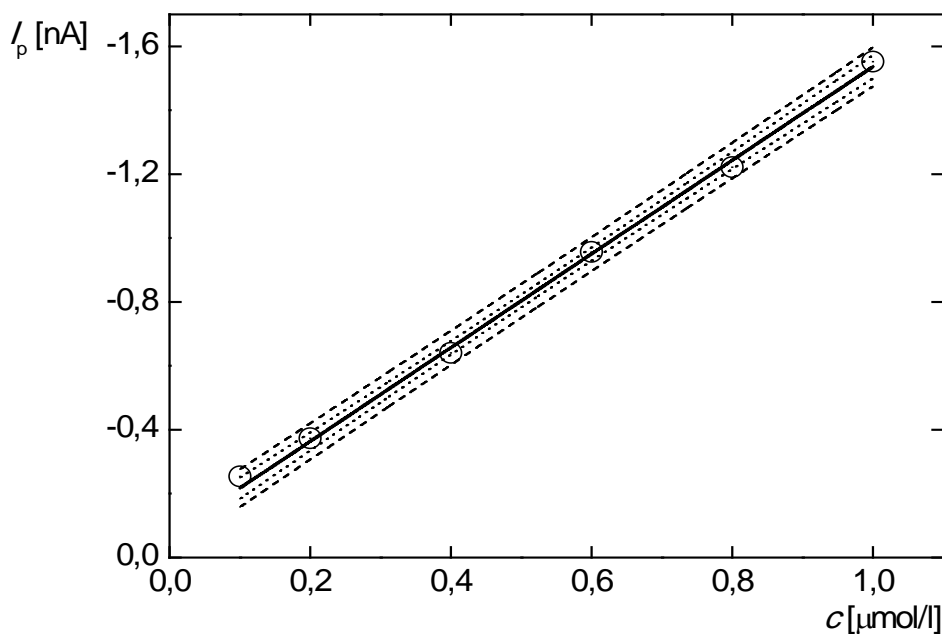
5. Stanovení 2-aminofluoren-9-onu v modelových vzorcích pitné a říční vody

Jako vzorek pitné vody byla použita voda z vodovodu v laboratoři č. 113 v budově chemických kateder PřF UK, Hlavova 8, Praha 2. Pitná voda byla odtočena po dobu 5 minut a potom byl odebrán vzorek. Vzorek říční vody byl odebrán z Labe v Nymburce u Sportovního centra, 1500 m proti proudu od vodní elektrárny v Nymburce.

Koncentrační závislosti byly měřeny metodami DCV a DPV na HMDE a DCV a DPV na m-AgSAE v koncentračním rozmezí 1×10^{-5} až 1×10^{-7} mol/l v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná (říční) voda (1:9). Příklad stanovení v pitné vodě je zobrazen na obr. 23 a kalibrační závislost na obr. 24, kdy metodou DCV na m-AgSAE s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV bylo měřeno rozmezí koncentrací 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol/l v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná voda (1:9). Pro koncentrace nižší než 1×10^{-7} mol/l byla využita metoda AdSDPV v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná (říční) voda (1:9). V těchto prostředí bylo na HMDE při optimálních podmínkách $E_{\text{acc}} = +100$ mV a $t_{\text{acc}} = 120$ s změřeno rozmezí koncentrací 2×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l, pro které jsou voltamogramy v říční vodě zobrazeny na obr. 25 s příslušnou kalibrační závislostí zobrazenou na obr. 26. V prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná voda (1:9) bylo možné metodou AdSDPV na HMDE naměřit i rozmezí 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l. Metoda AdSDPV byla využita pro modelové vzorky i na m-AgSAE, kdy při regeneračních potenciálech $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV a optimálních podmínkách akumulace $E_{\text{acc}} = +200$ mV a $t_{\text{acc}} = 180$ s bylo v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná (říční) voda (1:9) naměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l, které je v obou případech popsáno nelineární regresní funkcí. Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN v pitné vodě jsou uvedeny v tabulce 5 a v říční vodě v tabulce 6. Nelineární závislosti byly proloženy polynomem druhého stupně a získané rovnice jsou uvedeny pod tabulkami 5 a 6.



Obr. 23 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou DCV na *m*-AgSAE s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v rozmezí koncentrací 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná voda (1:9). Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 1×10^{-7} (1); 2×10^{-7} (2); 4×10^{-7} (3); 6×10^{-7} (4); 8×10^{-7} (5); 1×10^{-6} (6).



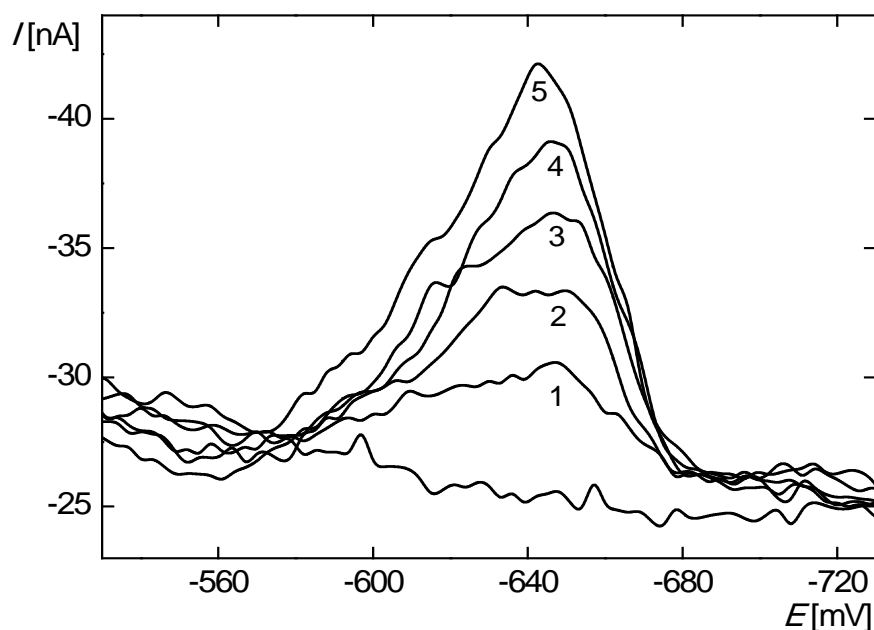
Obr. 24 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena metodou DCV na *m*-AgSAE v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná voda (1:9). Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 5

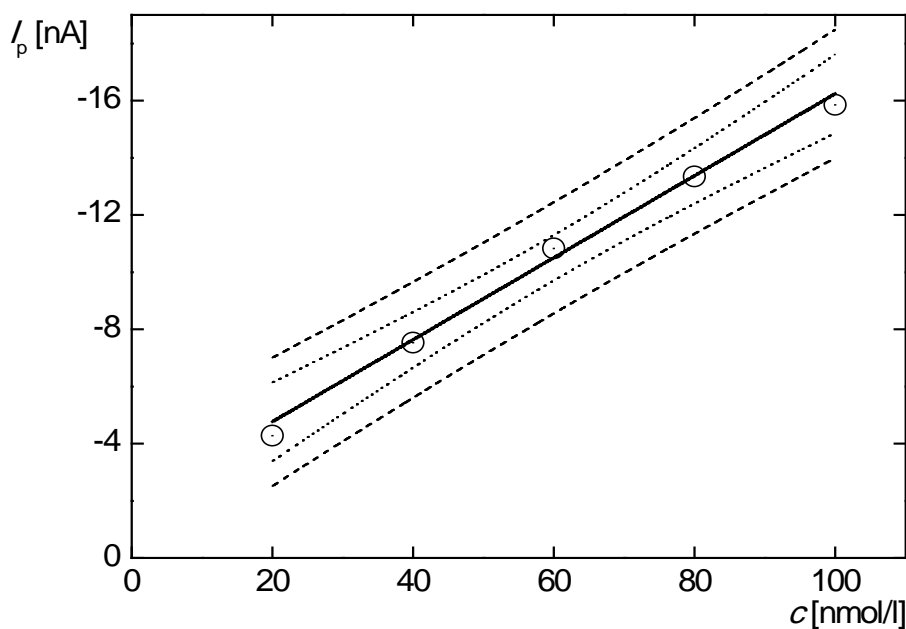
Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná voda (1:9) voltametrickými metodami na HMDE a m-AgSAE.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
DCV / HMDE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	____ b,d	____ b,d	____ b,d	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-36,04 \pm 0,91$	$-1,67 \pm 0,55^c$	0,9968	1×10^{-7}
DPV / HMDE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	____ b,e	____ b,e	____ b,e	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-49,3 \pm 1,6$	$1,70 \pm 0,99^c$	0,9946	8×10^{-8}
AdSDPV/ HMDE				
2×10^{-8} až 1×10^{-7}	$-637,6 \pm 33,0$	$-4,0 \pm 2,2^c$	0,9894	–
2×10^{-9} až 1×10^{-8}	$-633,0 \pm 31,3$	$-0,25 \pm 0,21^c$	0,9903	4×10^{-9}
DCV / m-AgSAE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,783 \pm 0,023$	$-1,64 \pm 0,15$	0,9966	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,466 \pm 0,023$	$-0,071 \pm 0,014$	0,9988	2×10^{-7}
DPV / m-AgSAE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,732 \pm 0,023$	$-1,57 \pm 0,15$	0,9962	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,320 \pm 0,026$	$-0,0041 \pm 0,0155$	0,9981	2×10^{-7}
AdSDPV / m-AgSAE				
1×10^{-8} až 1×10^{-7}	____ b,f	____ b,f	____ b,f	1×10^{-8}

a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), b – závislost není lineární, c – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, d – I_p [nA] = $(1,22 \pm 0,40)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-20,9 \pm 4,8)c$ [$\mu\text{mol}/\text{l}$] + (-36 ± 13) , $R^2 = 0,9889$, e – I_p [nA] = $(1,88 \pm 0,59)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-30,6 \pm 7,2)c$ [$\mu\text{mol}/\text{l}$] + (-41 ± 19) , $R^2 = 0,9729$, f – I_p [nA] = $(363 \pm 43)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-70,5 \pm 4,8)c$ [$\mu\text{mol}/\text{l}$] + $(-0,12 \pm 0,10)$, $R^2 = 0,9945$.



Obr. 25 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDE v rozmezí koncentrací 2×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – říční voda (1:9) při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 2×10^{-8} (1); 4×10^{-8} (2); 6×10^{-8} (3); 8×10^{-8} (4); 1×10^{-7} (5).



Obr. 26 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l měřena metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – říční voda (1:9) při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 6

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – říční voda (1:9) voltametrickými metodami na HMDE a m-AgSAE.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
DCV / HMDE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	____ b,d	____ b,d	____ b,d	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-23,97 \pm 0,74$	$0,84 \pm 0,45^c$	0,9952	2×10^{-7}
DPV / HMDE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	____ b,e	____ b,e	____ b,e	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-35,30 \pm 0,98$	$-2,08 \pm 0,65^c$	0,9969	2×10^{-7}
AdSDPV / HMDE				
2×10^{-8} až 1×10^{-7}	$-143,5 \pm 8,8$	$-1,90 \pm 0,59^c$	0,9850	2×10^{-8}
DCV / m-AgSAE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,625 \pm 0,019$	$-2,19 \pm 0,13$	0,9961	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,443 \pm 0,027$	$-0,142 \pm 0,017$	0,9982	4×10^{-7}
DPV / m-AgSAE				
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-0,586 \pm 0,015$	$-1,867 \pm 0,097$	0,9975	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$-1,384 \pm 0,029$	$-0,001 \pm 0,017$	0,9979	2×10^{-7}
AdSDPV / m-AgSAE				
1×10^{-8} až 1×10^{-7}	____ b,f	____ b,f	____ b,f	4×10^{-8}

a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), b – závislost není lineární, c – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, d – I_p [nA] = $(0,54 \pm 0,11)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-12,6 \pm 1,3)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + $(-31,2 \pm 3,5)$, $R^2 = 0,9939$, e – I_p [nA] = $(0,92 \pm 0,13)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-18,7 \pm 1,6)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + $(-39,0 \pm 4,2)$, $R^2 = 0,9928$, f – I_p [nA] = $(74,4 \pm 7,2)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-17,59 \pm 0,80)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + $(0,021 \pm 0,018)$, $R^2 = 0,9983$.

6. Předběžná separace a prekoncentrace pomocí extrakce tuhou fází

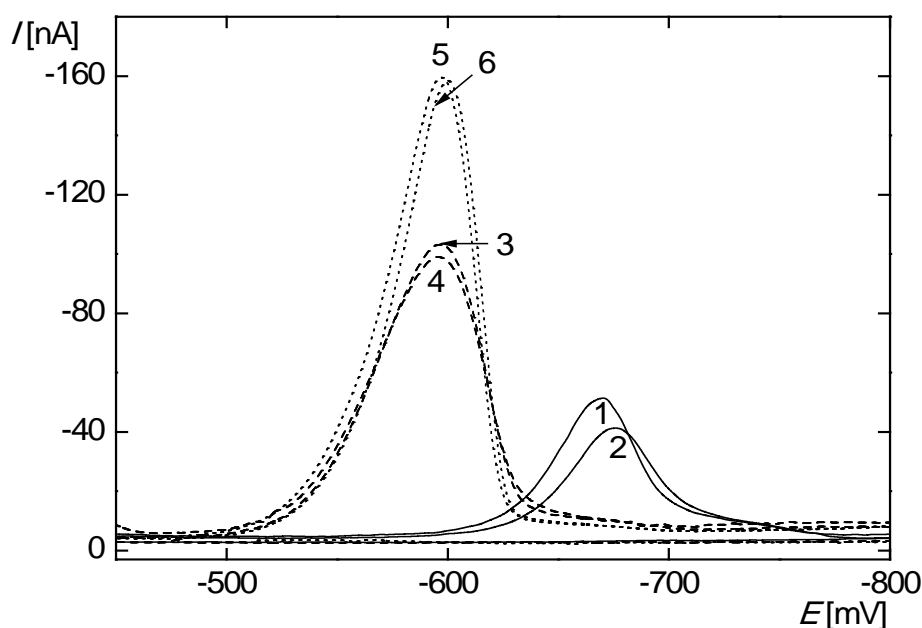
K separaci byly použity modelové vzorky deionizované, pitné a říční vody. Pro extrakci tuhou fází (SPE) byly použity kolonky LiChrolut RP-18 E (500 mg, CAT.NO.: 1.19849.0001, BATCH: K91327249, Merck, Darmstadt, Německo), které jsou dle údajů výrobce vhodné pro separaci slabě polárních látek z vodného prostředí. Tyto kolonky mají objem 3,0 ml a jsou naplněny 500 mg silikagelu s navázanou RP-18 fází. Kolonka byla napojena na extraktor, který byl přes pojistnou nádobu spojen s pumpou, která zajišťovala podtlak. Podtlak byl kontrolován manometrem a byl udržován na 50 kPa. Připravené vzorky 2-AFN v říční vodě byly před SPE přefiltrovány přes filtry MNGF-3 (průměr 50 mm, Macherey-Nagel, Düren, Německo).

SPE 2-AFN z vodného roztoku byla prováděna následujícím postupem: kolonka byla aktivována promytím 10 ml methanolu a následně promyta 10 ml deionizované vody. Poté byl přes kolonku přesát modelový vzorek vody. Zachycený 2-AFN byl eluován přímo do odměrné baňky a poté doplněn acetátovým pufrům o pH 4,0. Po promíchání byl roztok převeden do voltametrické nádoby a po odstranění kyslíku byl zaznamenán voltamogram. Shodným postupem byl připraven slepý pokus. Procentuální výtěžek SPE byl určen z poměru I_p / I_p^0 , kde I_p je výška píku po SPE vodného roztoku 2-AFN o příslušné koncentraci a I_p^0 je výška píku 2-AFN v roztoku připraveném extrakcí slepého vzorku, k němuž byl po SPE přidán potřebný objem zásobního roztoku 2-AFN.

6.1 Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází

Prvotní optimalizace SPE byla zaměřena na nalezení vhodného rozpouštědla pro eluci analytu z hlediska dosažení vysokého výtěžku, množství potřebného k eluci a snadnosti odpaření rozpouštědla do sucha. Do 100-ml odměrné baňky byl přidán odpovídající objem zásobního roztoku 2-AFN (výsledná $c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l). 2-AFN zachycený na kolonce byl postupně vymýván 1,0-ml dávkami methanolu, k úplné eluci 2-AFN došlo až po vymytí celkem 5,0 ml methanolu. Následně byl zaznamenán DP voltamogram a AdSDP voltamogram na HMDE v prostředí methanol–acetátový pufr o pH 4,0 (1:1). Pro snížení organické fáze bylo měření zopakováno se stejnou koncentrací, ale jako eluční činidlo byl použit 1,0 ml acetonu a opět zaznamenán DP voltamogram a AdSDP voltamogram na HMDE v prostředí aceton–acetátový pufr o pH 4,0 (1:9). Následně bylo měření zopakováno a elučním činidlem byl 1,0 ml acetonu, který byl následně odpařen do sucha a opět zaznamenán

DP voltamogram a AdSDP voltamogram na HMDE, nyní v prostředí 10 ml acetátového pufru o pH 4,0. Shodným postupem byly připraveny odpovídající slepé pokusy. AdSDP voltamogramy na HMDE byly naměřené při optimálních podmínkách akumulace $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s (kapitola 3.2.1) a jsou zobrazeny na obr. 27. Získané výtěžky pro obě metody jsou uvedeny v tabulce 7.



Obr. 27 Voltamogramy 2-AFN ($c \approx 1 \times 10^{-6}$ mol/l) měřené metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředích: methanol – acetátový pufr o pH 4,0 (1:1) (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (1) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (2)); aceton – acetátový pufr o pH 4,0 (1:9) (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (3) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (4)); acetátového pufru o pH 4,0 (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (5) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (6)).

Tabulka 7

Parametry SPE 2-AFN z 100 ml ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) deionizované vody do 10 ml ($c \approx 1 \times 10^{-6}$ mol/l) měřené metodou DPV a AdSDPV na HMDE.

Technika	Prostředí	I_p^a	I_p^{0a}	Výtěžek	s_r (výtěžku) ^b
		[nA]	[nA]	[%]	($n = 4$) [%]
DPV	methanol – acet. pufr o pH 4,0 (1:1)	–25,3	–29,2	86,6	6,3
DPV	aceton – acet. pufr o pH 4,0 (1:9)	–38,5	–41,1	93,7	5,7
DPV	acet. pufr o pH 4,0	–51,4	–52,4	98,1	1,5
AdSDPV	methanol – acet. pufr o pH 4,0 (1:1)	–37,1	–46,3	80,1	11,5
AdSDPV	aceton – acet. pufr o pH 4,0 (1:9)	–90,9	–95,3	95,4	2,9
AdSDPV	acet. pufr o pH 4,0	–147,2	–150,4	97,9	1,3

^a – hodnota jednoho měření zobrazeného na obr. 27, ^b – relativní směrodatná odchylka v rámci série po sobě jdoucích měření výtěžků SPE

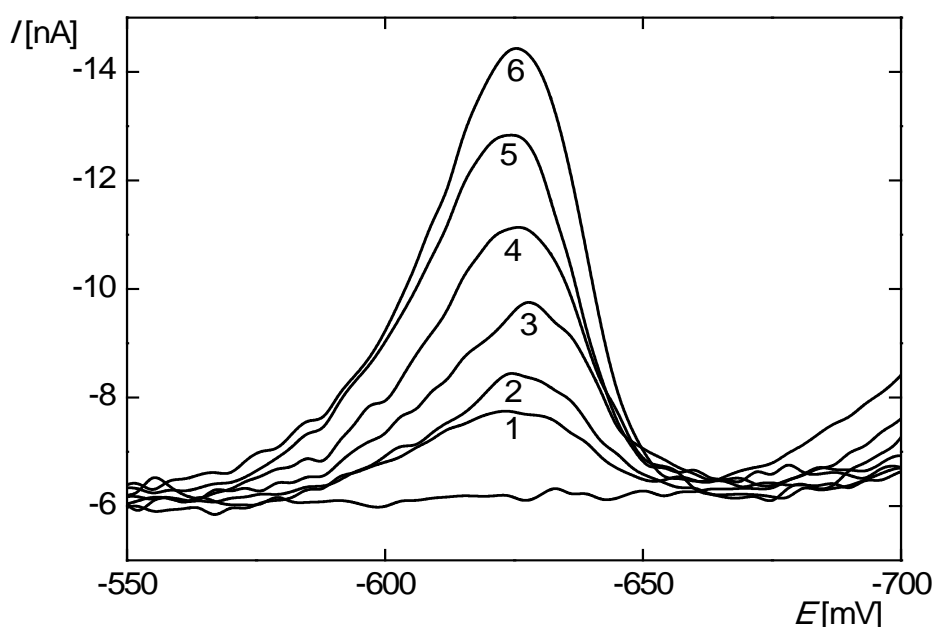
Z hodnot uvedených v tabulce byl pro SPE zvolen jako optimální následující postup: eluce 2-AFN z kolonky 1,0 ml acetonu, následné odpařením do sucha a voltametrické měření v prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Čím nižší byl obsah organické složky, tím vyšší byl signál látky, a tedy i lepší adsorpce 2-AFN na povrch HMDE. Vyšší byl i výtěžek a nižší s_r výtěžku měření. Výsledky optimálního postupu jsou vyjádřeny ve formě: průměr $\pm L_{1/2}(s_r, n)$. V prostředí acetátového pufru o pH 4,0 metodou DPV byl výtěžek $98,1 \pm 2,6$ % ($s_r = 1,5$ %, $n = 4$) a metodou AdSDPV byl výtěžek $98,7 \pm 1,7$ % ($s_r = 1,3$ %, $n = 4$). Pro metodu AdSDPV, která byla dále využita, byl prekoncentrační faktor $k = 9,87$ ($k_{\text{teor}} = 10$).

6.2 Stanovení 2-aminofluoren-9-onu po extrakci tuhou fází

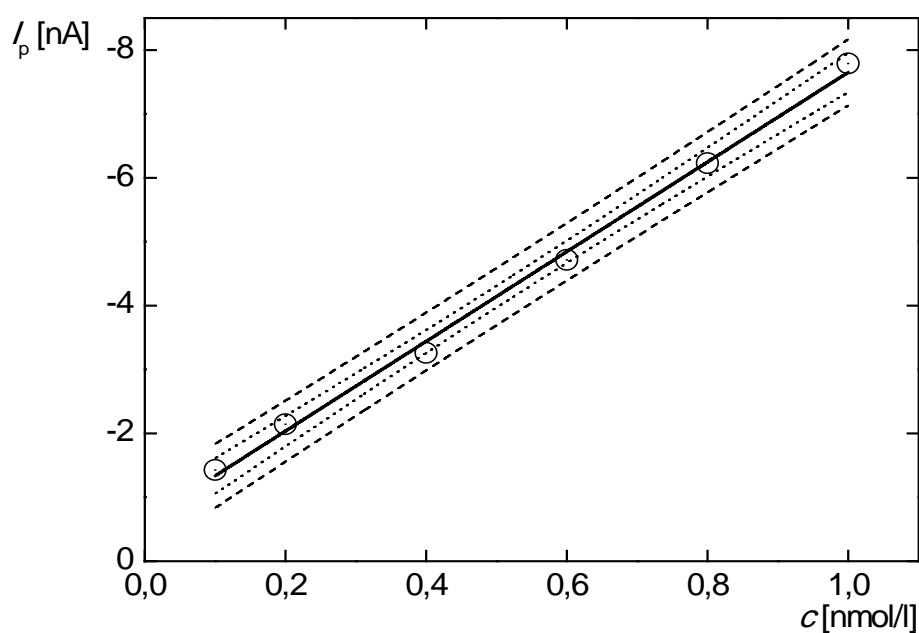
6.2.1 Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z deionizované vody

Nejprve byl optimální postup pro stanovení 2-AFN v modelových vzorcích vody vyzkoušen na SPE z deionizované vody jako ideální modelové matrice. K převedení 2-AFN z vody do organické fáze byla použita technika SPE s následnou elucí 2-AFN 1,0 ml acetonu a odpařením do sucha. Metodou AdSDPV na HMDE (s předřazenou SPE) v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{\text{acc}} = +100$ mV a $t_{\text{acc}} = 120$ s bylo změřeno koncentrační

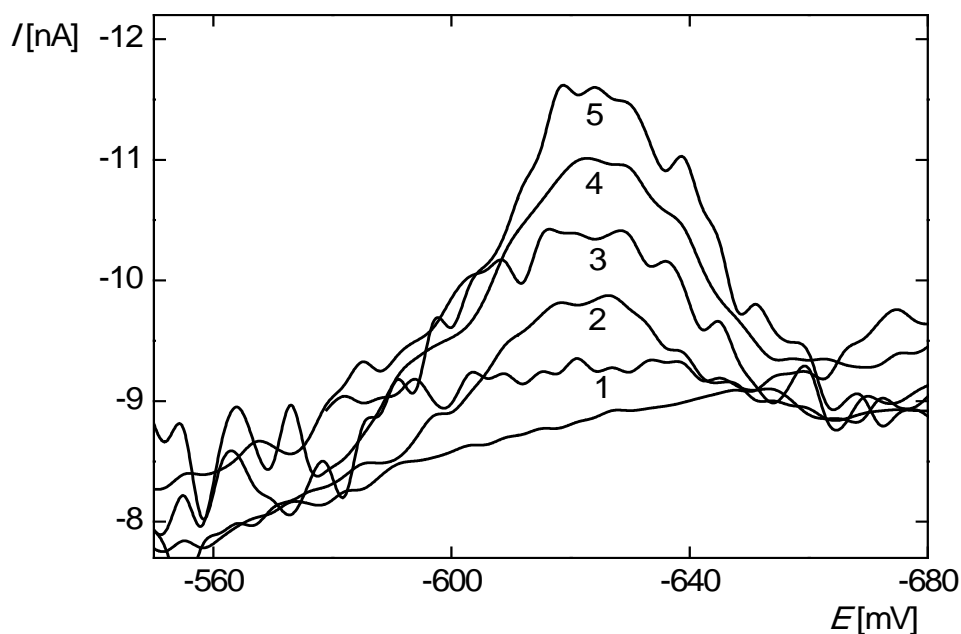
rozmezí 1×10^{-10} až 1×10^{-9} mol/l (obr. 28) (odpovídající kalibrační závislost po SPE je zobrazena na obr. 29); při SPE došlo k zakonzentrování analytu ze 100 ml deionizované vody (koncentrace 1×10^{-10} až 1×10^{-9} mol/l 2-AFN) do 10 ml (koncentrace 1×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l 2-AFN), tedy teoretický prekonzentrační faktor $k_{\text{teor}} = 10$. Následně bylo stejnou metodou, za stejných podmínek a ve stejném prostředí, změřeno koncentrační rozmezí 2×10^{-11} až 1×10^{-10} mol/l (obr. 30) (odpovídající kalibrační závislost po SPE je zobrazena na obr. 31); při SPE došlo k zakonzentrování analytu ze 100 ml deionizované vody (koncentrace 2×10^{-11} až 1×10^{-10} mol/l 2-AFN) do 1,0 ml (koncentrace 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l 2-AFN) ($k_{\text{teor}} = 100$). Parametry získaných kalibračních přímků jsou uvedeny v tabulce 8.



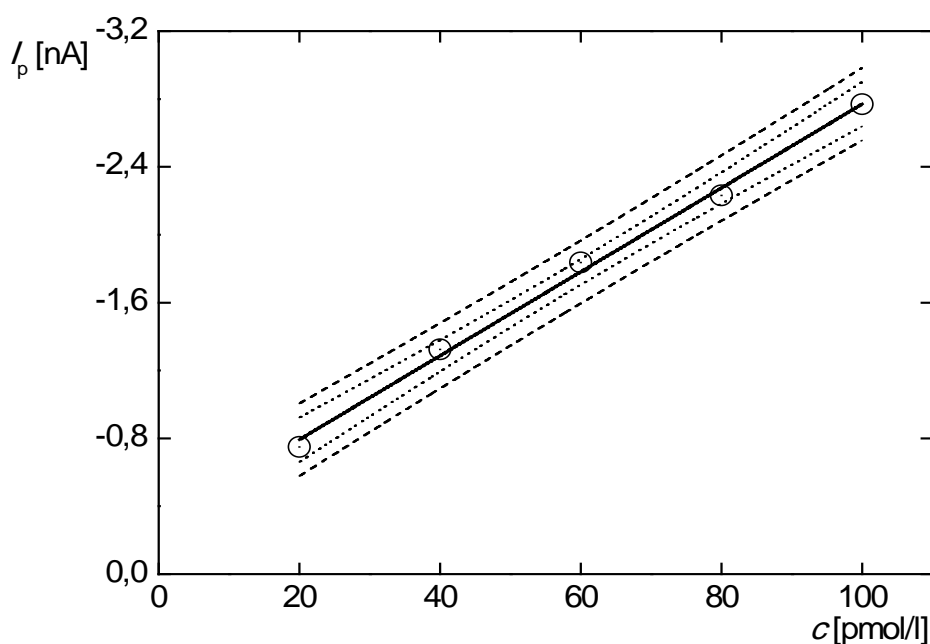
Obr. 28 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDE při $E_{\text{acc}} = +100$ mV a $t_{\text{acc}} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 po SPE ze 100 ml deionizované vody do 10 ml. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml deionizované vody (mol/l): 1×10^{-10} (1); 2×10^{-10} (2); 4×10^{-10} (3); 6×10^{-10} (4); 8×10^{-10} (5) a 1×10^{-9} (6).



Obr. 29 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN po SPE ze 100 ml deionizované vody (koncentrace 1×10^{-10} až 1×10^{-9} mol/l 2-AFN) do 10 ml měřena metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 30 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 po SPE ze 100 ml deionizované vody do 1,0 ml. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml deionizované vody (mol/l): 2×10^{-11} (1); 4×10^{-11} (2); 6×10^{-11} (3); 8×10^{-11} (4) a 1×10^{-10} (5).



Obr. 31 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN po SPE z 100 ml deionizované vody (koncentrace 2×10^{-11} až 1×10^{-10} mol/l 2-AFN) do 1,0 ml měřeno metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 8

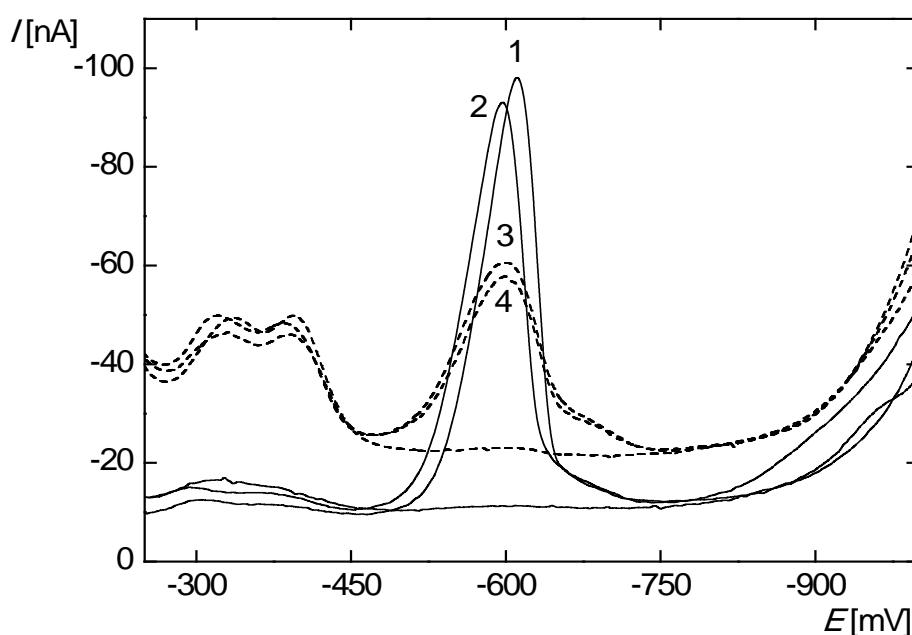
Parametry kalibračních přímek 2-AFN po SPE z deionizované vody měřené metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s.

Koncentrační rozmezí ve vodě [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
SPE ze 100 ml do 10 ml				
1×10^{-10} až 1×10^{-9}	-7020 ± 190	$-0,63 \pm 0,17$	0,9963	2×10^{-10}
SPE ze 100 ml do 1,0 ml				
2×10^{-11} až 1×10^{-10}	-24720 ± 840	$-0,299 \pm 0,056$	0,9954	4×10^{-11}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$)

6.2.2 Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z pitné a říční vody

Pro získání výtěžku SPE z pitné a říční vody byl do 100-ml odměrné baňky s pitnou či říční vodou přidán vhodný objem zásobního roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) a následně byl využit již získaný optimální postup pro SPE s následnou elucí 2-AFN 1,0 ml acetonu a odpařením do sucha. Metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s byly proměřeny voltamogramy po SPE z pitné a říční vody (obr. 32). Stejným způsobem jako u deionizované vody byly připraveny slepé vzorky. Procentuální výtěžek SPE je uveden v tabulce 9.



Obr. 32 Voltamogramy 2-AFN ($c \approx 1 \times 10^{-6}$ mol/l) měřené metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Extrakce z: pitné vody (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (1) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (2)) a říční vody (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (3) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (4)).

Tabulka 9

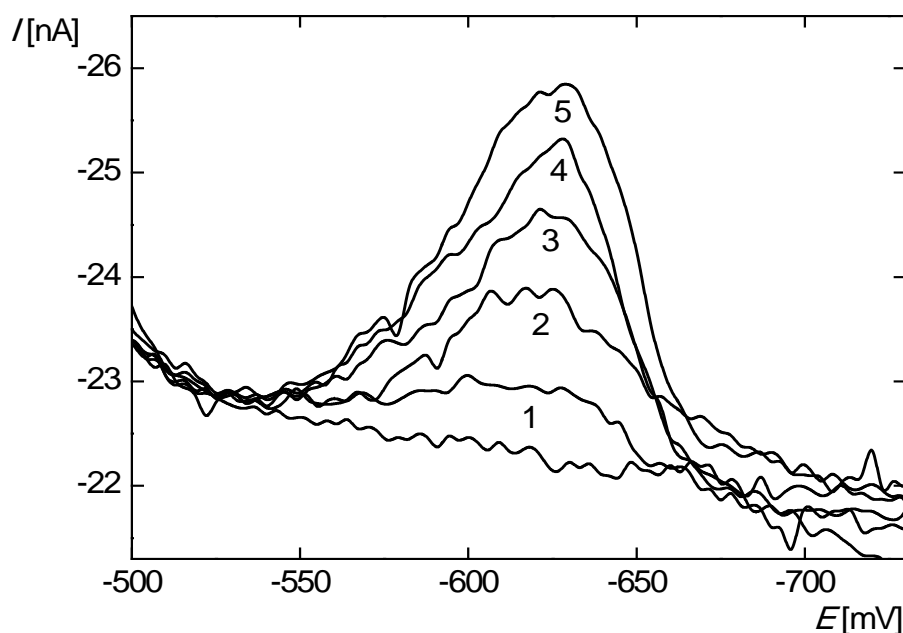
Parametry extrakce 2-AFN ze 100 ml ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol/l) pitné a říční vody do 10 ml ($c \approx 1 \times 10^{-6}$ mol/l) měřené metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s.

Extrakce	I_p^a [nA]	I_p^{0a} [nA]	Výtěžek [%]	s_r (výtěžku) ^b ($n = 4$) [%]
z pitné vody	-80,70	-85,86	94,0	2,6
z říční vody	-36,22	-32,66	90,2	3,8

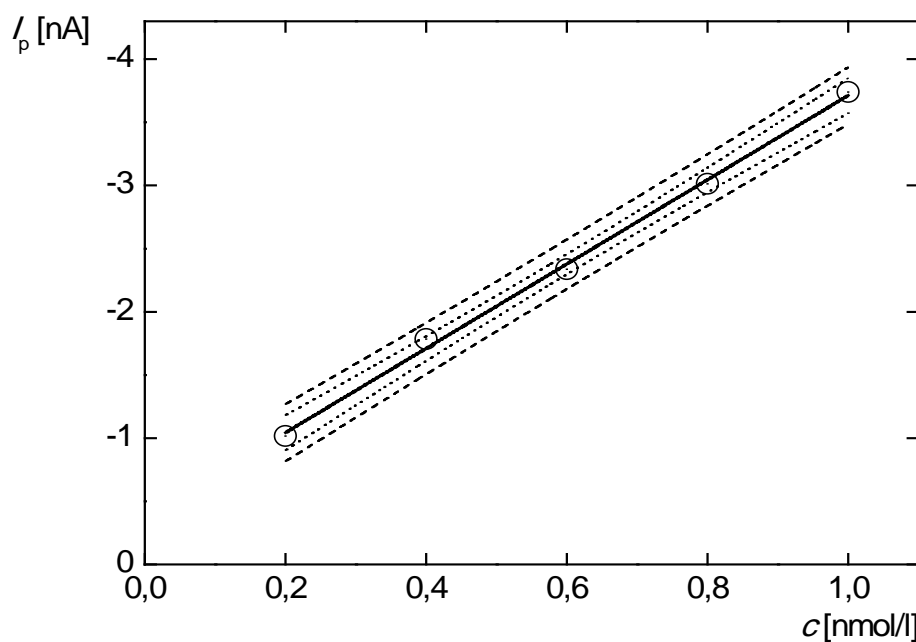
^a – hodnota jednoho měření zobrazeného na obr. 32, ^b – relativní směrodatná odchylka v rámci série po sobě jdoucích měření výtěžků SPE

Výsledky výtěžků SPE jsou vyjádřeny ve formě: průměr $\pm L_{1/2}(s_r, n)$. Technikou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s byl po SPE z pitné vody získán výtěžek $94,4 \pm 4,0$ % ($s_r = 2,6$ %, $n = 4$), $k = 9,44$ ($k_{teor} = 10$) a po SPE z říční vody byl výtěžek $92,6 \pm 5,4$ % ($s_r = 3,8$ %, $n = 4$), $k = 9,26$ ($k_{teor} = 10$).

Využitím SPE byl 2-AFN extrahován ze 100 ml pitné a říční vody (koncentrace 2×10^{-10} až 1×10^{-9} mol/l 2-AFN) do 10 ml (koncentrace 2×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l 2-AFN) ($k_{teor} = 10$), a následně byly roztoky změřeny metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Za stejných podmínek a ve stejném prostředí byly změřeny roztoky po SPE. Ze 100 ml pitné vody (koncentrace 4×10^{-11} až 1×10^{-10} mol/l 2-AFN) došlo k zakoncentrování do 1,0 ml (koncentrace 4×10^{-9} až 1×10^{-8} mol/l 2-AFN) ($k_{teor} = 100$), ale bohužel nebylo možné toto měření provést i pro SPE z říční vody s $k_{teor} = 100$ z důvodu nevyhodnotitelného signálu 2-AFN. Voltamogramy získané po SPE z říční vody s $k_{teor} = 10$ jsou zobrazeny na obr. 33 a příslušná kalibrační závislost na obr. 34. Parametry získaných kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce 10.



Obr. 33 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 po SPE ze 100 ml říční vody do 10 ml. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml říční vody (mol/l): 2×10^{-10} (1); 4×10^{-10} (2); 6×10^{-10} (3); 8×10^{-10} (4) a 1×10^{-9} (5).



Obr. 34 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN po SPE ze 100 ml říční vody (koncentrace 2×10^{-10} až 1×10^{-9} mol/l 2-AFN) do 10 ml měřena metodou AdSDPV na HMDE při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí acetátového pufru o pH 4,0. Predikční (---) a konfidenční pásy (.....) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 10

Parametry kalibračních přímek stanovení 2-AFN po SPE z pitné a říční vody měřené metodou AdSDPV na HMDE v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 při $E_{acc} = +100$ mV a $t_{acc} = 120$ s.

Koncentrační rozmezí ve vodě [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
<i>extrakce z pitné vody</i>				
SPE ze 100 ml do 10 ml				
2×10^{-10} až 1×10^{-9}	-5360 ± 120	$-0,465 \pm 0,077$	0,9982	4×10^{-10}
SPE ze 100 ml do 1,0 ml				
4×10^{-11} až 1×10^{-10}	-11840 ± 480	$0,278 \pm 0,036$	0,9950	6×10^{-11}
<i>extrakce z říční vody</i>				
SPE ze 100 ml do 10 ml				
2×10^{-10} až 1×10^{-9}	-3338 ± 88	$-0,376 \pm 0,059$	0,9972	4×10^{-10}

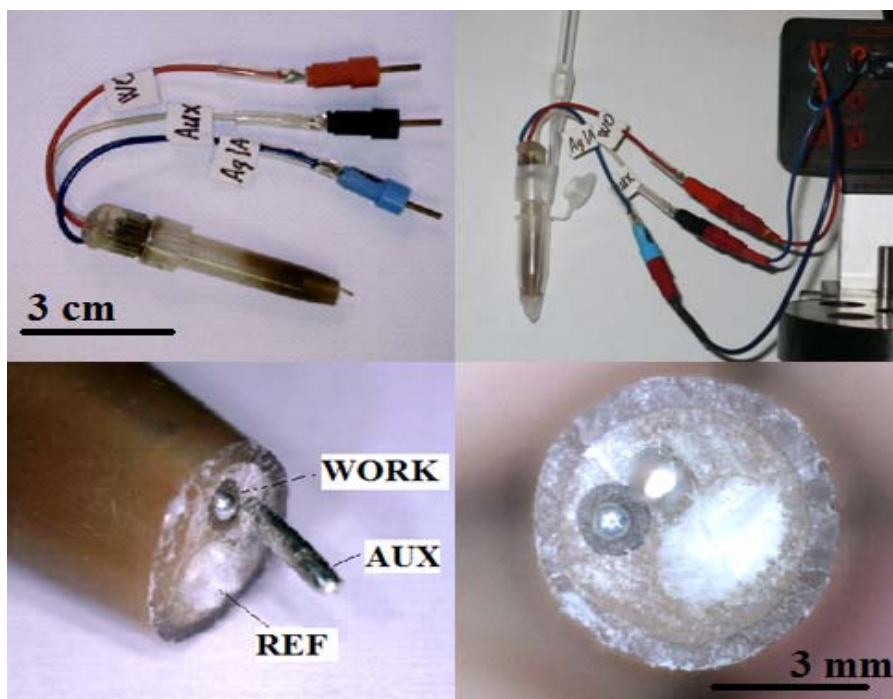
^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$)

SPE se ukázala jako velmi vhodná metoda pro realizaci stanovení 2-AFN v praxi; zde poskytne separaci a prekoncentraci analytu, a tím sníží hodnotu L_Q . Pomocí techniky SPE z deionizované a pitné vody byl 2-AFN zkoncentrován ze 100 ml až do 1,0 ml ($k_{teor} = 100$), a následným měřením metodou AdSDPV bylo dosaženo až o dva koncentrační řády nižší hodnoty L_Q než bez využití SPE. V říční vodě bylo možné dosáhnout snížení hodnoty L_Q přibližně o řád. Techniky SPE s následnou akumulací 2-AFN na povrch HMDE lze využít pro environmentální praxi, kde je předpokládán výskyt 2-AFN v akvatických systémech v nanomolárních až pikomolárních koncentracích.

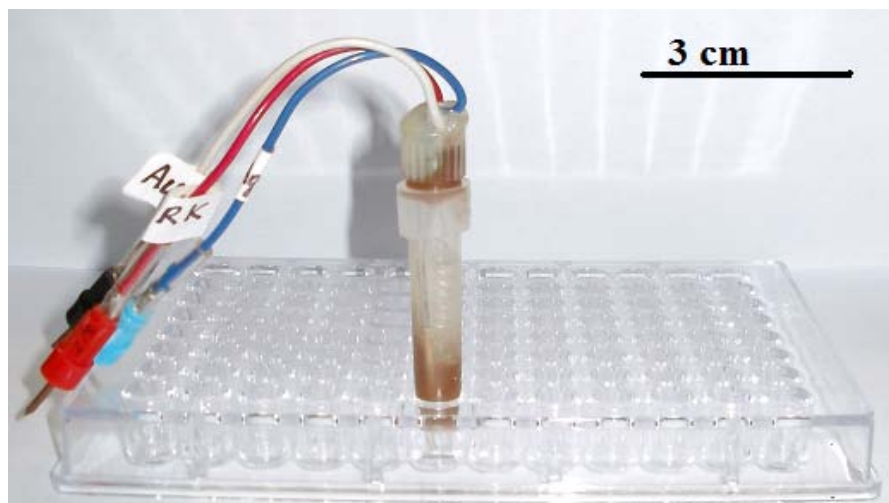
7. Miniaturizovaný systém elektrod

Při neustálém vývoji vysoce citlivých metod pro stanovení prioritních environmentálních polutantů je jedním z hlavních trendů vývoj komplexních miniaturizovaných systémů použitelných při měřeních v polních podmínkách. Za tímto účelem byl v této diplomové práci testován nově zkonstruovaný miniaturizovaný systém elektrod sestavený Ing. Bogdanem Yosypchukem, Ph.D. (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha). Přínos tohoto prototypu spočívá v možnosti jednoduchých terénních měření bez nutnosti mít u sebe křehké elektrody (např. skleněné). V praxi by byl použit miniaturizovaný systém elektrod, analyzátor o malé velikosti a notebook, takže by toto měřicí zařízení bylo skutečně snadno přenosné. Dalším využitím je možnost stanovení analytu ve 100- μ l objemech vzorku.

Miniaturizovaný systém elektrod obsahoval v jednom těle referentní argentschloridovou elektrodu, pomocnou platinovou i pracovní rtuťovým meniskem modifikovanou stříbrnou pevnou amalgamovou elektrodu. Příprava elektrody k měření byla prováděna podle obecného postupu doporučeného pro amalgamové pracovní elektrody, tedy stejně jako při přípravě m-AgSAE (amalgamace, elektrochemická aktivace a regenerace, kapitola 2.3.2). Měření bylo prováděno v Eppendorfově zkumavce (vhodně upravené pro tvar mikroelektrody), do níž byl dusík zaváděn úzkou, dlouhou pipetovací špičkou o objemu 10 μ l (obr. 35). V budoucnu se počítá s měřením v mikrotitrační destičce s jamkami pro malé objemy (obr. 36).

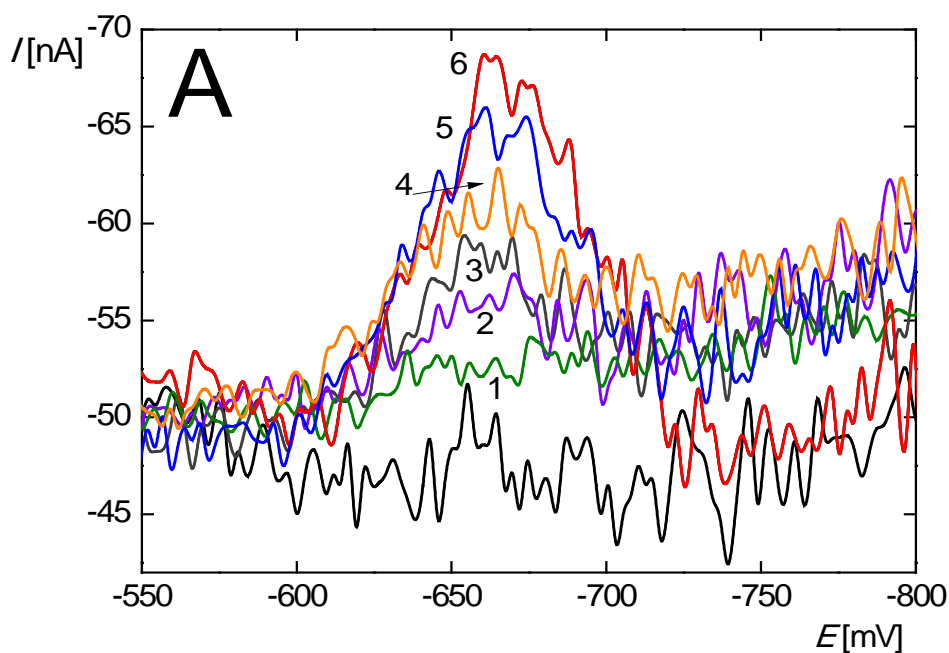


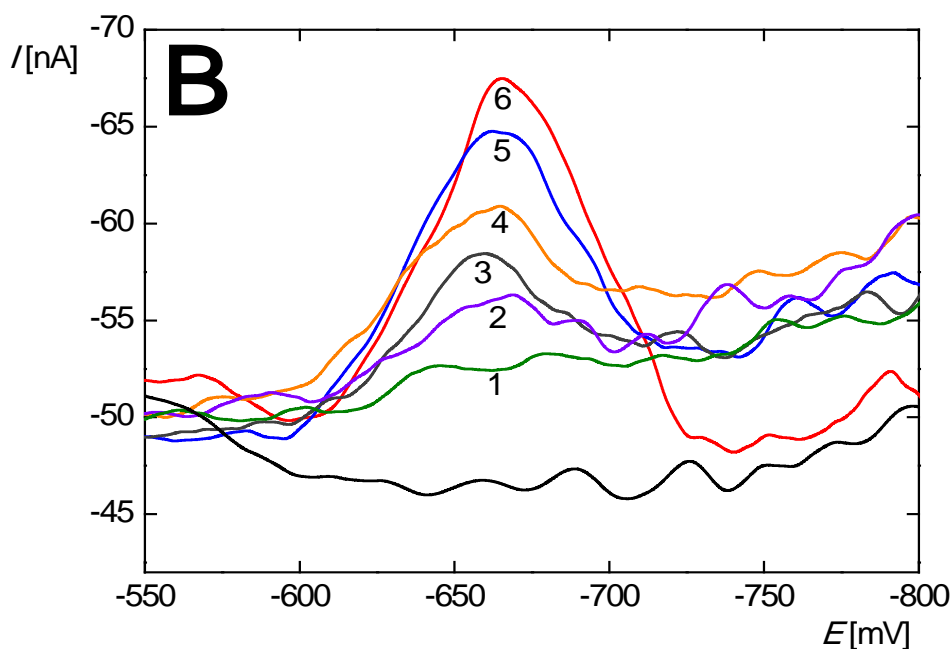
Obr. 35 Sestrojený miniaturizovaný systém elektrod obsahující referentní (REF), pomocnou (AUX) i pracovní elektrodu m-AgSAE (WORK) v jednom těle.



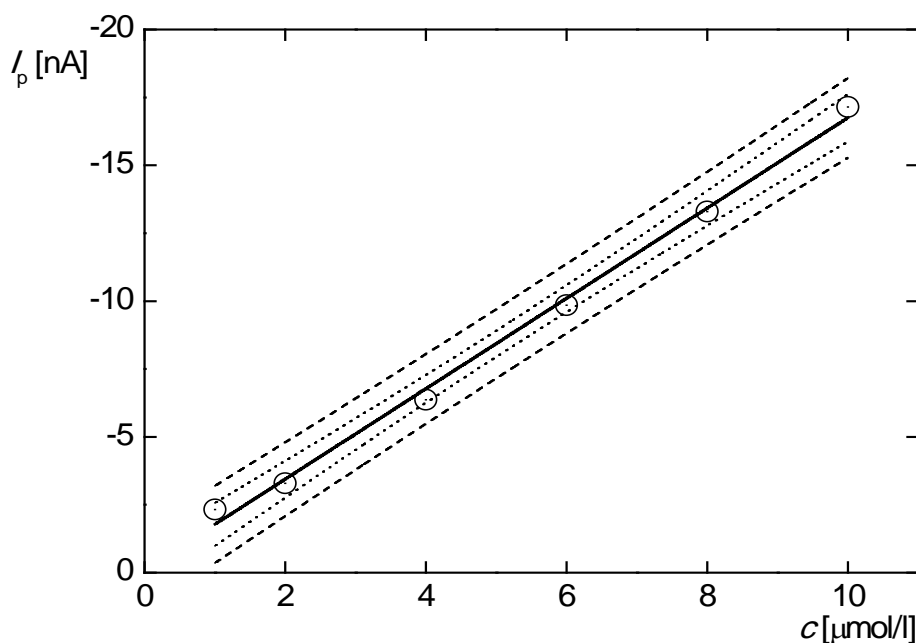
Obr. 36 Sestrojený miniaturizovaný systém elektrod s mikrotitrační destičkou s jamkami pro měření 100-mikrolitrových objemů.

Pro měření byly využity již získané optimální podmínky (kapitola 4.1.2): prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) a regenerační potenciály $E_{\text{reg},1} = 0$ mV a $E_{\text{reg},2} = -1200$ mV. Koncentrační závislost byla měřena technikou DPV v koncentračním rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol/l. Jelikož voltametrické odezvy 2-AFN v koncentračním řádu 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l vykazovaly značný šum, byly křivky pomocí matematických operací v programu Origin vyhlazeny (obr. 37). Přítomný šum neumožňoval měřit nižší koncentrace než 1×10^{-6} mol/l. Kalibrační závislost toho koncentračního řádu je zobrazena na obr. 38. Parametry získaných kalibračních přímk jsou uvedeny v tabulce 11.





Obr. 37 Voltamogramy 2-AFN měřené metodou DPV na miniaturizovaném systému elektrod s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v rozmezí koncentrací 1×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) ve $100 \mu\text{l}$ objemu vzorku. Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 1×10^{-6} (1); 2×10^{-6} (2); 4×10^{-6} (3); 6×10^{-6} (4); 8×10^{-6} (5); 1×10^{-5} (6): A) původní voltamogramy a B) voltamogramy vyhlazené pomocí programu Origin.



Obr. 38 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN měřena metodou DPV na miniaturizovaném systému elektrod v koncentračním rozmezí 1×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) ve $100 \mu\text{l}$ objemu vzorku. Predikční (---) a konfidenční pásy (·····) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 11

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN metodou DPV na miniaturizovaném systému elektrod s regenerací $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$ v prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) ve 100 μl objemu vzorku.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2	L_Q^a [mol/l]
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-1,108 \pm 0,023$	$-10,7 \pm 1,5$	0,9983	–
1×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-1,664 \pm 0,054$	$-0,12 \pm 0,33^b$	0,9947	1×10^{-6}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^b – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

Šum je nejspíše způsoben celkovým sestavením těla elektrody, ale vzhledem k jednoduchosti přípravy celého elektrodového systému bude možné v budoucnu jistě připravit prototyp poskytující voltametrické odezvy s nižším šumem. Miniaturizovaný systém elektrod lze tedy pro stanovení 2-AFN využít, i když $L_Q \approx 1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ není zcela uspokojivá. Pro snížení L_Q by byla možnost měření ve 100- μl (a menších) objemech vhodná při kombinaci s prekoncentrací pomocí SPE. Lze předpokládat zakoncentrování pomocí SPE až z 1000 ml na objem 100 μl ($k_{\text{teor}} = 10\,000$).

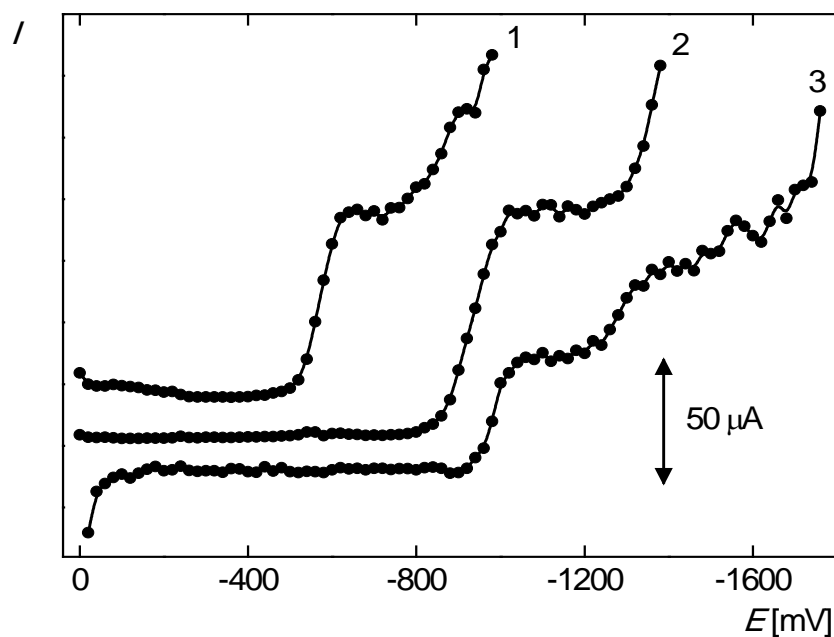
8. Metody k objasnění mechanismu redukce 2-aminofluoren-9-onu

2-AFN je redukovatelná látka, jejíž elektrochemická aktivita je v prostředí methanol – BR pufr (1:9) závislá na pH. Karbonylová skupina na aromatickém systému (oxoskupina) je obecně redukována v protických prostředích za výměny 2 elektronů na skupinu alkoholovou [76,79]. Při zkoumání mechanismu elektrochemické přeměny 2-AFN byla použita technika coulometrie za konstantního potenciálu (CPC) na rtuťovém dně (MPE) a cyklická voltametrie (CV) na HMDE a m-AgSAE.

8.1 Coulometrie 2-aminofluoren-9-onu

Pro určení počtu elektronů vyměňovaných při redukci 2-AFN (z) bylo využito coulometrie za konstantního potenciálu (CPC). Analýza byla prováděna v tříelektrodovém zapojení v míchaném roztoku v upravené voltametrické nádobce. Pracovní elektrodou bylo rtuťové dno (MPE) o povrchu $2,27 \text{ cm}^2$. Pomocná platinová elektroda byla umístěna ve fritě, která byla naplněna základním elektrolytem (methanol – BR pufr (1:9)), aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku produkty vznikajícími na povrchu pomocné elektrody. Při CPC je klasickým postupem měření závislosti proudu na čase a vypočtení prošlého náboje následnou integrací plochy pod křivkou. Tento postup není příliš přesný, a proto na přístroji byla zvolena možnost přímého měření závislosti prošlého náboje na čase při konstantním vloženém potenciálu.

Nejprve byly měřeny závislosti proudu na čase ($t = 5 \text{ s}$) při jednotlivých potenciálech od 0 po -2000 mV . Bylo zaznamenáno vždy 5 hodnot proudů při určitém potenciálu, který se měnil po -20 mV . Získané hodnoty byly použity pro sestrojení hydrodynamických voltamogramů, ve kterých byla vynesena závislost proudů protékajících MPE na vloženém potenciálu v prostředí methanol – BR pufr o pH 2,0; 7,0 a 12,0 (1:9) (obr. 39). Z hydrodynamických voltamogramů byly určeny vhodné potenciály pro provedení elektrolýzy (E_{elec}) (tabulka 12).



Obr. 39 Hydrodynamické voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené na MPE v míchaném roztoku v prostředí methanol – BR pufr (1:9). BR pufr o pH: 2,0 (1); 7,0 (2) a 12,0 (3).

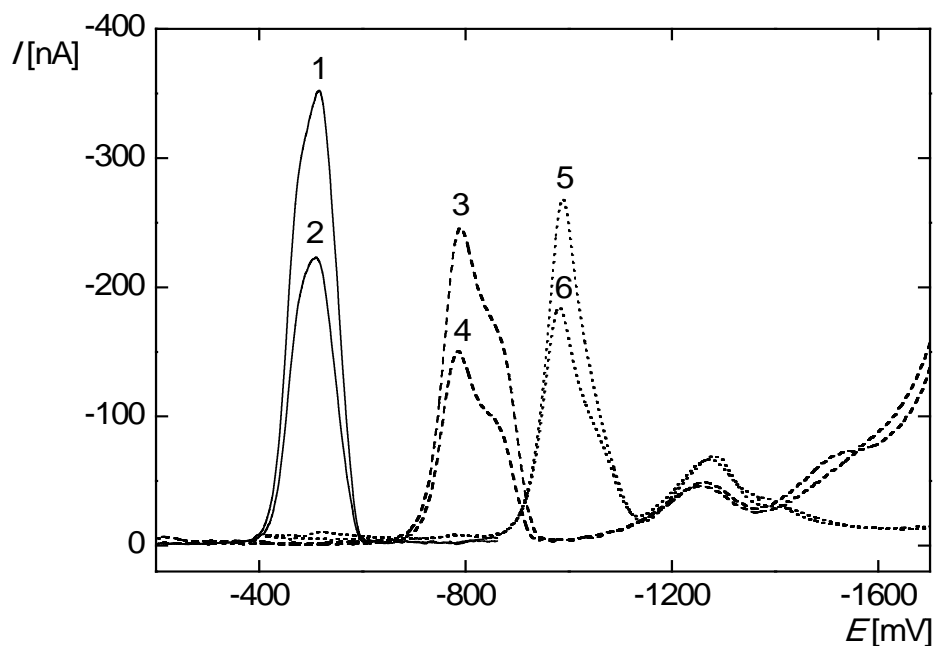
Tabulka 12

Vhodné potenciály určené z hydrodynamických voltamogramů pro provedení CPC na MPE v prostředí methanol – BR pufr (1:9).

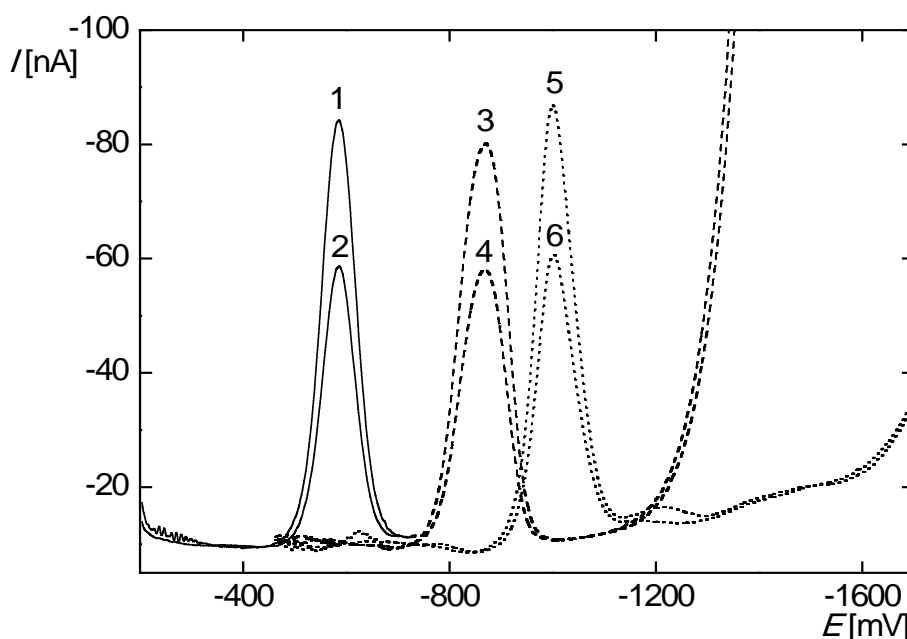
pH BR pufru	$E_{\text{elec.}}$ [mV]
2,0	-700
7,0	-1150
12,0	-1200

Poté byla změřena výška píku (I_0) 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) v prostředích methanol – BR pufr o pH 2,0; 7,0 a 12,0 (1:9) technikou DPV na HMDE (obr. 40) a na m-AgSAE (obr. 41). Roztoky byly převedeny do upravené voltametrické nádoby s MPE a za neustálého míchání a bublání byla provedena částečná elektrolýza při konstantním E_{elec} po dobu 20 minut, z níž byly získány hodnoty prošlého náboje (Q) potřebné k provedení částečné elektrolýzy 2-AFN. Od Q látky byl odečten náboj prošlý při elektrolýze základního elektrolytu (Q_{ze}). Po částečné

elektrolýze byla změřena výška píku 2-AFN (I_1) opět technikami DPV na HMDE (obr. 40) a na m-AgSAE (obr. 41).

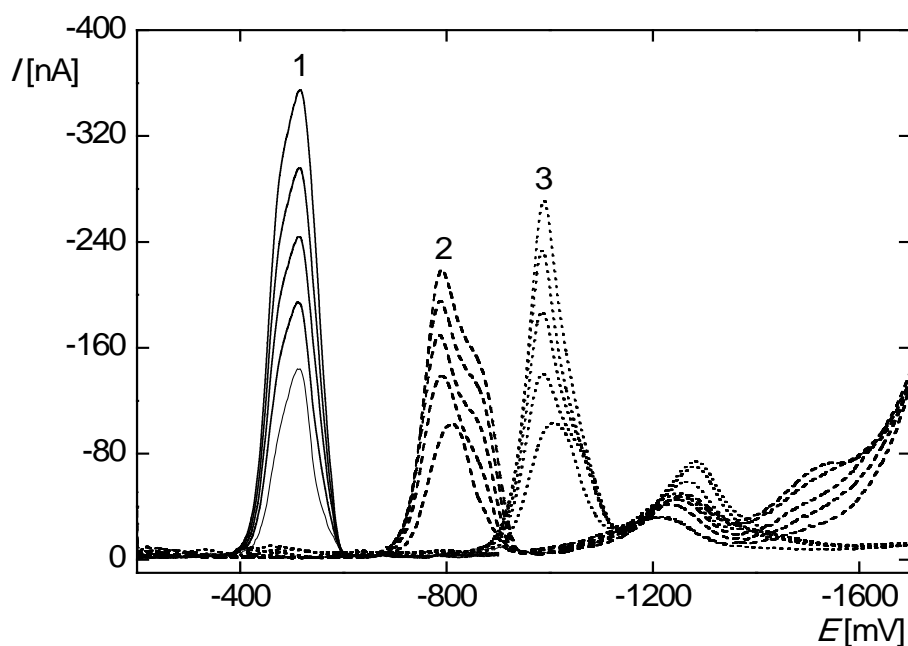


Obr. 40 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou DPV na HMDE v míchaném roztoku v prostředí methanol – BR pufr (1:9) o pH: 2,0 (před elektrolýzou (1) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -700$ mV (2)), 7,0 (před elektrolýzou (3) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -1150$ mV (4)) a 12,0 (před elektrolýzou (5) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -1200$ mV (6)).

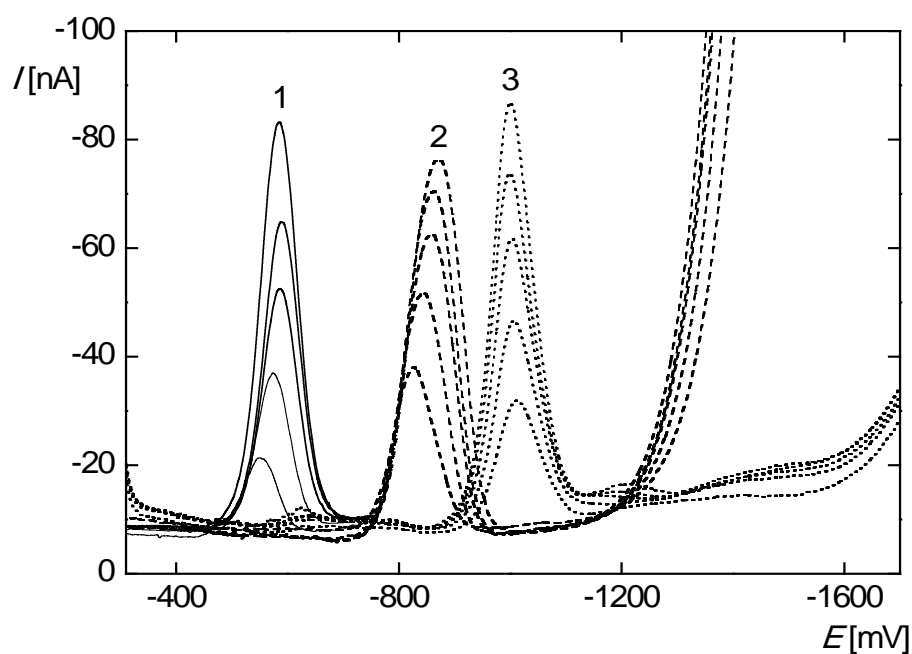


Obr. 41 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou DPV na m-AgSAE v míchaném roztoku v prostředí methanol – BR pufr (1:9) o pH: 2,0 (před elektrolýzou (1) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -700$ mV (2)), 7,0 (před elektrolýzou (3) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -1150$ mV (4)) a 12,0 (před elektrolýzou (5) a po potenciostatické elektrolýze $E_{elec} = -1200$ mV (6)).

Z již pozorované nelineární závislosti proudové odezvy 2-AFN na koncentraci vykazující ve vyšších koncentracích vysokou hodnotu úseku (kapitola 3.1.2), nebylo možné pro výpočet poklesu množství látky využít přímou úměrnost, proto byly naměřeny kalibrační závislosti pro prostředí methanol– BR pufr o pH 2,0; 7,0 a 12,0 technikou DPV na HMDE (obr. 42) a na m-AgSAE (obr. 43). Ze získaných regresních rovnic (tabulka 13) byla vypočítána změna látkového množství 2-AFN (Δn) a ze získaných nábojů pomocí Faradayova zákona počet vyměňovaných elektronů (z). Získané hodnoty z byly zaokrouhleny na nejbližší celá čísla. Měření bylo prováděno třikrát a opakovatelnost série po sobě jdoucích měření se pohybovala od 5,0 do 10 %. Pro měření na HMDE jsou naměřené a vypočítané hodnoty uvedeny v tabulce 14 a pro m-AgSAE v tabulce 15.



Obr. 42 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací 1×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l v prostředí methanol – BR pufr (1:9). BR pufr o pH: 2,0 (1); 7,0 (2) a 12,0 (3).



Obr. 43 Voltamogramy 2-AFN měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací 1×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l v prostředí methanol – BR pufr (1:9). BR pufr o pH: 2,0 (1); 7,0 (2) a 12,0 (3).

Tabulka 13

Parametry kalibračních přímek stanovení 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l technikou DPV na HMDE a na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9).

Prostředí	Směrnice [mA l/mol]	Úsek [nA]	R^2
HMDE			
methanol – BR pufr o pH 2,0 (1:9)	$-2,604 \pm 0,046$	$-85,4 \pm 3,0$	0,9988
methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:9)	$-1,683 \pm 0,083$	$-69,4 \pm 5,5$	0,9903
methanol – BR pufr o pH 12,0 (1:9)	$-2,136 \pm 0,062$	$-41,6 \pm 4,1$	0,9966
m-AgSAE			
methanol – BR pufr o pH 2,0 (1:9)	$-0,718 \pm 0,027$	$0,55 \pm 1,79^a$	0,9943
methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:9)	— ^{b,c}	— ^{b,c}	— ^{b,c}
methanol – BR pufr o pH 12,0 (1:9)	$-0,644 \pm 0,015$	$-10,0 \pm 1,0$	0,9978

^a – úsek není statisticky významně odlišný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$,

^b – závislost není lineární, ^c – I_p [nA] = $(0,00413 \pm 0,00020)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-1,000 \pm 0,026)c$ [$\mu\text{mol/l}$] + $(-11,01 \pm 0,67)$, $R^2 = 0,9996$

Tabulka 14

Počet vyměňovaných elektronů (z) získaný při CPC na MPE při daném pH BR pufru za použití měření technikou DPV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr (1:9).

pH	E_{elec} [mV]	I_0 [nA]	I_1 [nA]	$(Q - Q_{ze})$ [mC]	Δn [μmol]	z
2,0	-700	-348	-222	87	0,47	$1,9 \approx 2$
7,0	-1150	-240	-149	96	0,53	$1,9 \approx 2$
12,0	-1200	-254	-165	81	0,42	$2,0 \approx 2$

Tabulka 15

Počet vyměňovaných elektronů (z) získaný při CPC na MPE při daném pH BR pufru za použití měření technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr (1:9).

pH	E_{elec}	I_0	I_1	$(Q - Q_{ze})$	Δn	z
	[mV]	[nA]	[nA]	[mC]	[μmol]	
2,0	-700	-73	-46	81	0,36	2,3 \approx 2
7,0	-1150	-70	-48	96	0,55	1,8 \approx 2
12,0	-1200	-75	-49	81	0,40	2,1 \approx 2

Získané údaje hodnot z potvrzují předpoklady z literatury, ve které je popisována redukce oxoskupiny za výměny 2 elektronů [76,79].

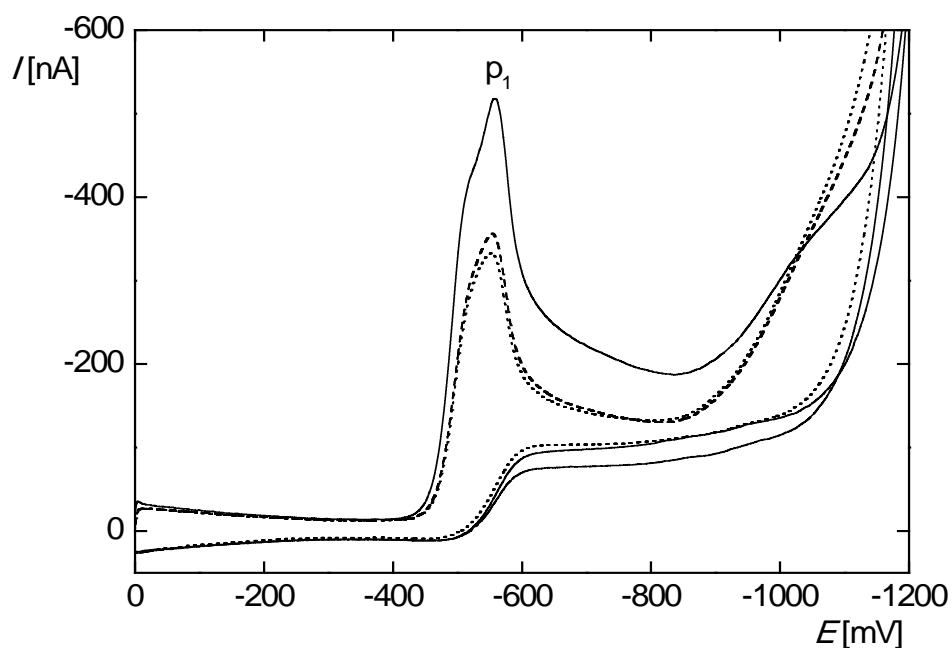
8.2 Cyklická voltametrie 2-aminofluoren-9-onu

Pro potvrzení navrhovaného redukčního mechanismu 2-AFN [1] byla použita technika CV na HMDE a m-AgSAE. Z cyklických voltamogramů lze získat informace o elektrochemickém ději, který na elektrodě probíhá a jeho kinetických parametrech. Základními nastavitelnými veličinami této techniky je počáteční a koncový potenciál a rychlost polarizace. Elektrodový děj může být reverzibilní, kvazireverzibilní nebo ireverzibilní [86].

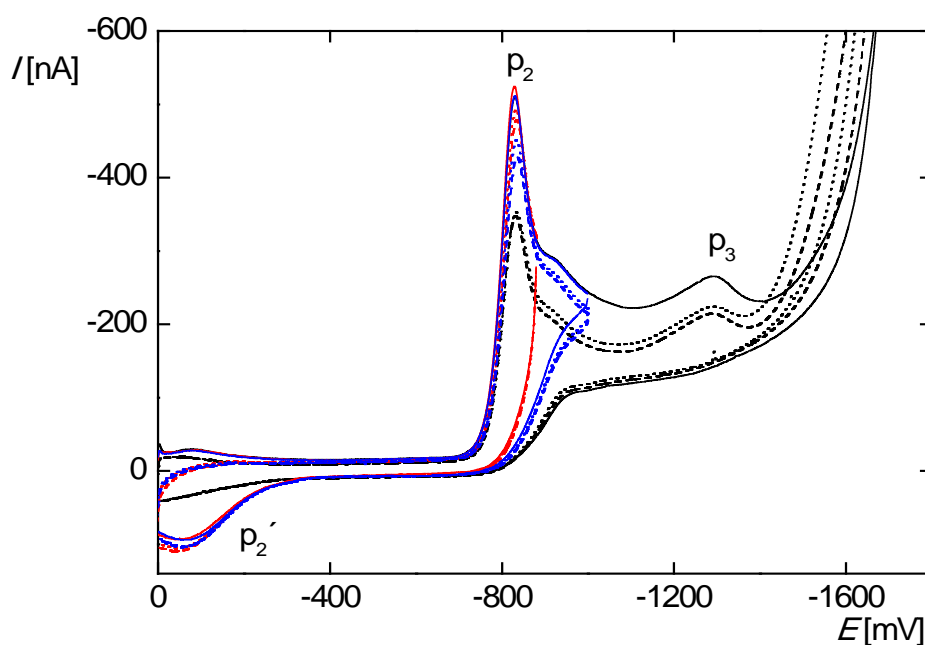
Cyklické voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) byly měřeny v prostředích methanol – BR pufr o pH 2,0; 7,0 a 13,0 (1:9) reprezentující kyselé, neutrální a zásadité prostředí při různém nastavení rychlosti polarizace: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 a 2000 mV/s. Pro zjištění druhu děje, kterým je elektrochemický děj řízen, byla vynesena závislost hodnoty proudu píku (I_p) na rychlosti polarizace (v) a na odmocnině rychlosti polarizace (\sqrt{v}). Pokud je závislost I_p na v lineární, potom je elektrochemický děj řízen adsorpcí, a pokud je závislost I_p na \sqrt{v} lineární, potom je elektrochemický děj řízen difúzí. Pokud není ani jedna závislost lineární jedná se o kombinaci difúze a adsorpce či příspěvek dalšího děje [86]. Technikou CV na HMDE a m-AgSAE (tři skeny pro obě elektrody) bylo podle počtu píků proměřeno potenciálové okno v různých rozmezích potenciálů, což zobrazují červeně a modře označené křivky na obr. 45, 46, 49.

8.2.1 Cyklická voltametrie na HMDE

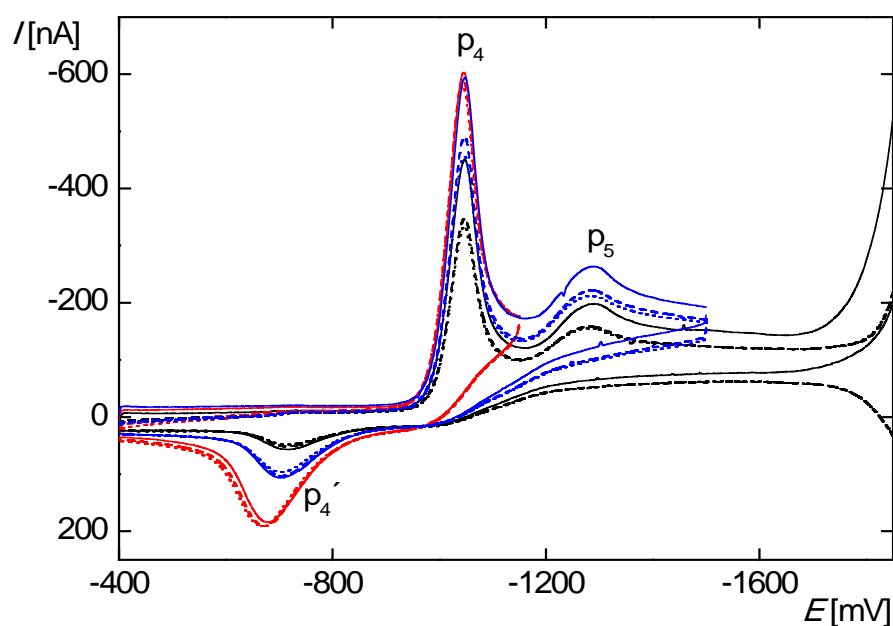
Cyklické voltamogramy 2-AFN na HMDE v kyselém prostředí BR pufru v celém potenciálovém okně poskytují pouze jeden katodický pík p_1 (obr. 44), který odpovídá redukci oxoskupiny v jednom dvouelektronovém ireverzibilním kroku za vzniku alkoholové skupiny. V prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:9) lze pozorovat dva zřetelně oddělené katodické píky p_2 a p_3 a je zde patrný i anodický pík p_2' (obr. 45). V neutrálním prostředí se při nízkých rychlostech polarizace 5 až 50 mV objevuje další pík, a to mezi píkem p_2 a p_3 při E_p od –910 až –940 mV o velikosti I_p –4 až –12 nA, který s rostoucí rychlostí polarizace zcela zaniká, a vyhodnotitelný je tedy jen pro velmi nízké rychlosti. V zásaditém prostředí se objevují při všech měřeních dva katodické píky p_4 a p_5 (obr. 46) a je zde více zřetelný, a tím i lépe vyhodnotitelný anodický pík p_4' , který je vyšší ve zúženém potenciálovém okně. Proto lze předpokládat, že se zvětšujícím se potenciálovým oknem dochází ke spotřebování produktu za vzniku jiné sloučeniny, a v roztoku tedy zbývá menší množství produktu, který lze zpětně oxidovat a proto je anodický pík p_4' menší při větším potenciálovém okně (anodický pík p_4' tedy reprezentuje redoxní pár ke katodickému píku p_4). V neutrálním a zásaditém prostředí odpovídá první pík p_2 a p_4 opět dvouelektrodové redukci 2-AFN na 2-aminofluoren-9-ol. Konkurenční reakcí může být dimerizace dvou radikálů 2-aminofluoren-9-olátu za vzniku chemické sloučeniny pinakolátu (2,2'-diaamino-9,9'-bifluorenol), který není elektrochemicky redukovatelný, ale následnými chemickými přesmyky lze získat další produkty obsahující ve své struktuře redukovatelné oxoskupiny [87], které mohou být příčinou druhých píků v neutrálním a zásaditém prostředí p_3 a p_5 . Jelikož tuto hypotézu nelze potvrdit pouze pomocí CV a jedná se pouze o předpoklad, bylo by vhodné použitím metody NMR identifikovat produkty vznikající během elektrochemické redukce 2-AFN. V neutrálním a zásaditém prostředí je chování 2-AFN velmi podobné a v obou případech se jedná o kvazireverzibilní děje. Shrnutí cyklické voltametrie na HMDE v kyselém, neutrálním a zásaditém pH BR pufru při 50 mV/s je uvedeno v tabulce 16.



Obr. 44 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).



Obr. 45 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).



Obr. 46 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na HMDE v prostředí methanol – BR pufr o pH 13,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).

Tabulka 16

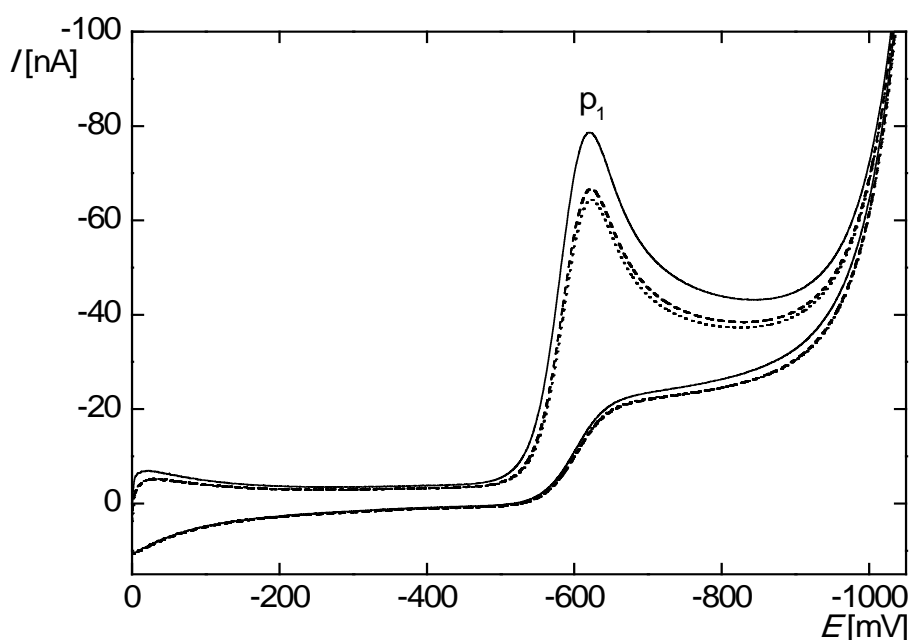
Shrnutí CV na HMDE v kyselém, neutrálním a zásaditém pH BR pufru při 50 mV/s.

pH BR pufru	Pík	E_p [mV]	$E_p - E_p'$ [mV]	Typ elektrochemického děje	Děj kontrolovaný
2,0	p ₁	-560	—	ireversibilní	adsorpcí
7,0	p ₂ / p _{2'}	-830 / -50	-780	kvazireverzibilní	— ^a
	p ₃	-1300	—	ireversibilní	— ^a
13,0	p ₄ / p _{4'}	-1050 / -700	-350	kvazireverzibilní	adsorpcí
	p ₅	-1290	—	ireversibilní	— ^a

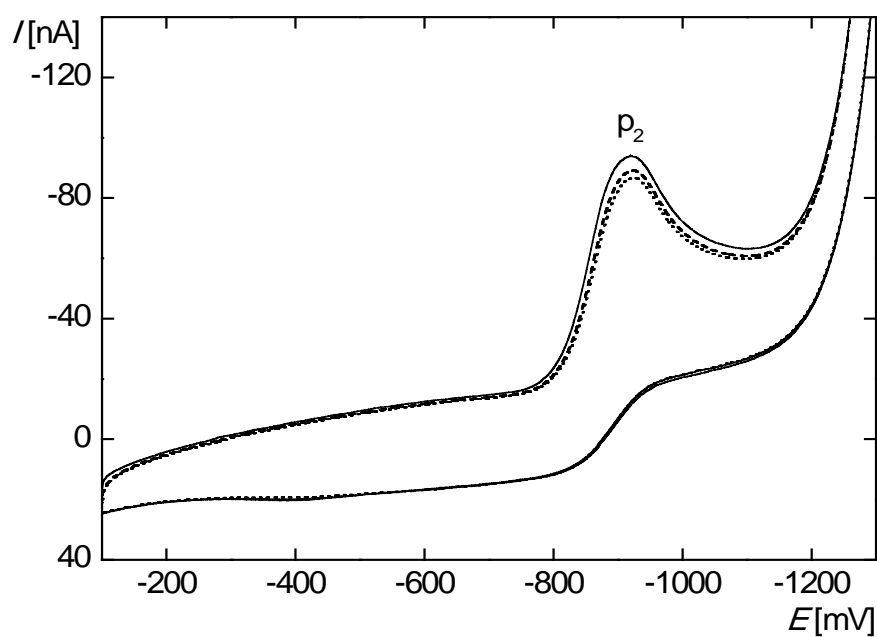
^a – děj je kontrolovaný kombinací difúze a adsorpce

8.2.2 Cyklická voltametrie na m-AgSAE

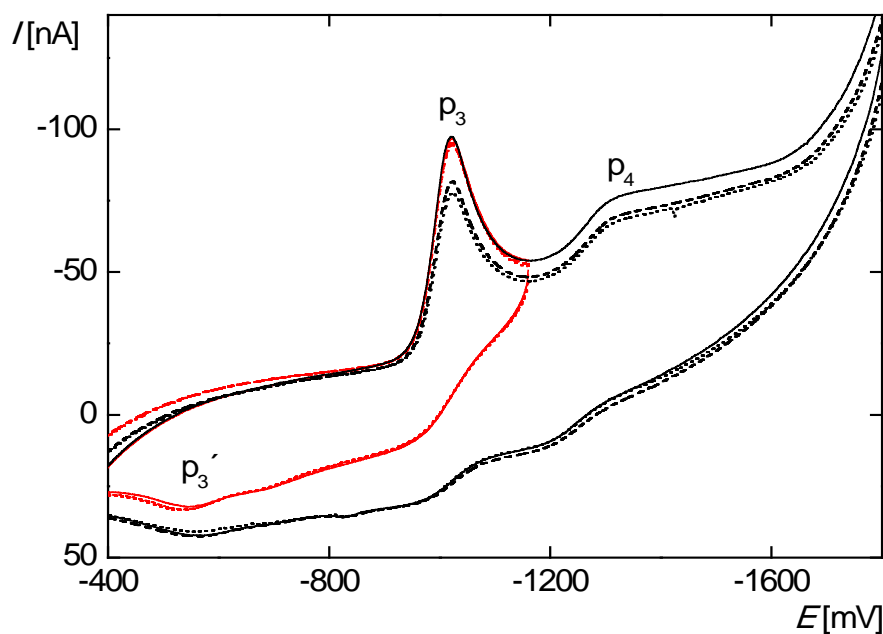
Pro CV byly využity již získané vhodné regenerační potenciály (tabulka 1, kapitola 2.3). Cyklické voltamogramy 2-AFN na m-AgSAE v kyselém prostředí BR pufru poskytují pouze jeden katodický pík p_1 (obr. 47) a v neutrálním prostředí také pouze jeden katodický pík p_2 (obr. 48). V zásaditém prostředí se objevují dva katodické píky p_3 a p_4 a také anodický pík p_3' , který není příliš velký a dobře vyhodnotitelný, a jedná se tedy o kvazireverzibilní děj. Na CV na m-AgSAE je vidět, že mechanismus na jiném povrchu probíhá mírně odlišným způsobem, ale opět dochází k redukci oxoskupiny 2-AFN na alkoholovou skupinu pomocí dvou elektronů. Shrnutí CV na m-AgSAE v kyselém, neutrálním a zásaditém pH BR pufru při 50 mV/s je uvedeno v tabulce 17.



Obr. 47 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 2,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).



Obr. 48 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).



Obr. 49 Voltamogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol– BR pufr o pH 13,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken (—); druhý sken (---) a třetí sken (.....).

Tabulka 17

Shrnutí CV na m-AgSAE v kyselém, neutrálním a zásaditém pH BR pufru při 50 mV/s.

pH BR pufru	Pík	E_p [mV]	$E_p - E_p'$ [mV]	Typ elektrochemického děje	Děj kontrolovaný
2,0	p ₁	-620	—	ireversibilní	difúzí
7,0	p ₂	-920	—	ireversibilní	— ^a
13,0	p ₃ / p _{3'}	-1020 / -550	470	kvazireversibilní	adsorpcí
	p ₄	-1320	—	ireversibilní	— ^a

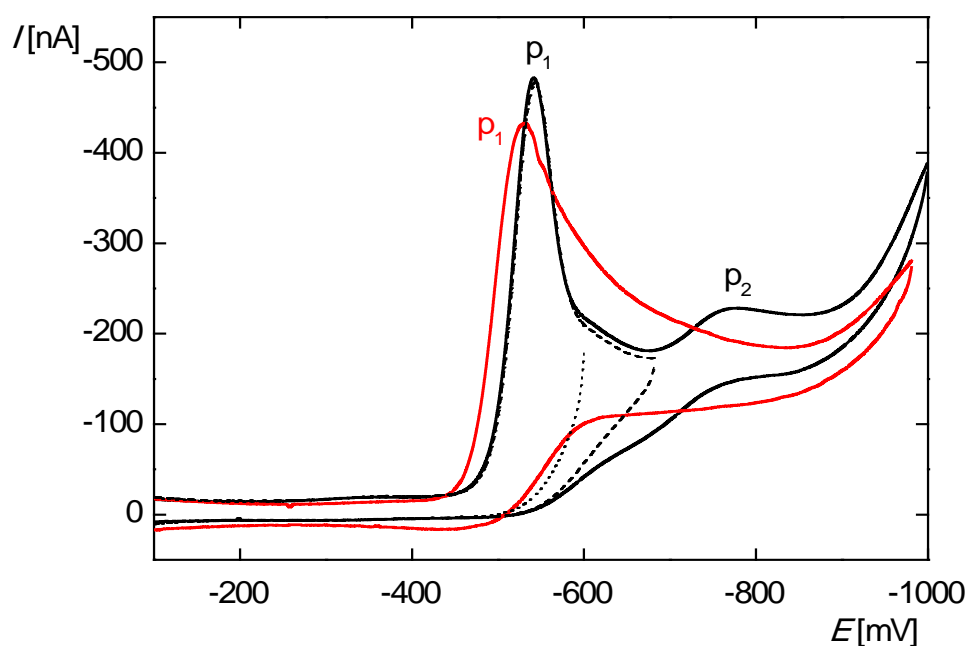
^a – děj je kontrolovaný kombinací difúze a adsorpce

8.3 Porovnání cyklické voltametrie 2-aminofluoren-9-onu a fluoren-9-onu

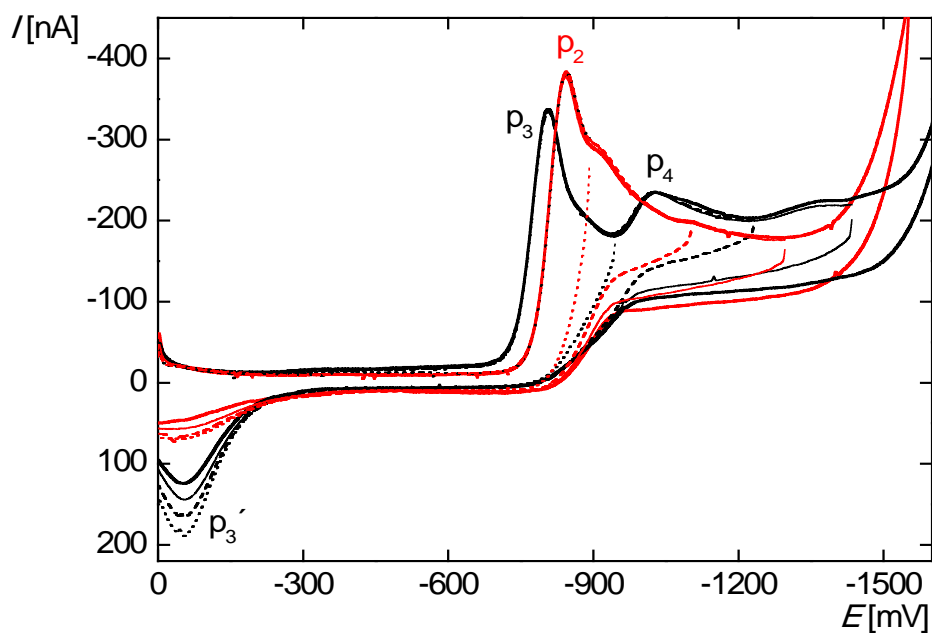
Jelikož při redukční přeměně 2-AFN dochází k redukci oxoskupiny, bylo voltametrické chování této látky srovnáno s voltametrickým chováním FN, který je prekurzorem 2-AFN majícím ve své struktuře přítomnou jen oxoskupinu, a tím byl pozorován vliv přítomnosti aminoskupiny. Protože je FN málo rozpustný v methanolu ve vyšších koncentracích, které jsou vhodnější pro studium mechanismu pomocí CV, byl FN i 2-AFN rozpuštěn v DMF a technikou CV byly změřeny voltamogramy 2-AFN i FN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) v prostředí DMF – BR pufr o pH 2,0; 7,0 a 13,0 (1:9) na HMDE i na m-AgSAE. U CV je 2-AFN značen červenou barvou pro odlišení od FN.

8.3.1 Porovnání cyklické voltametrie na HMDE

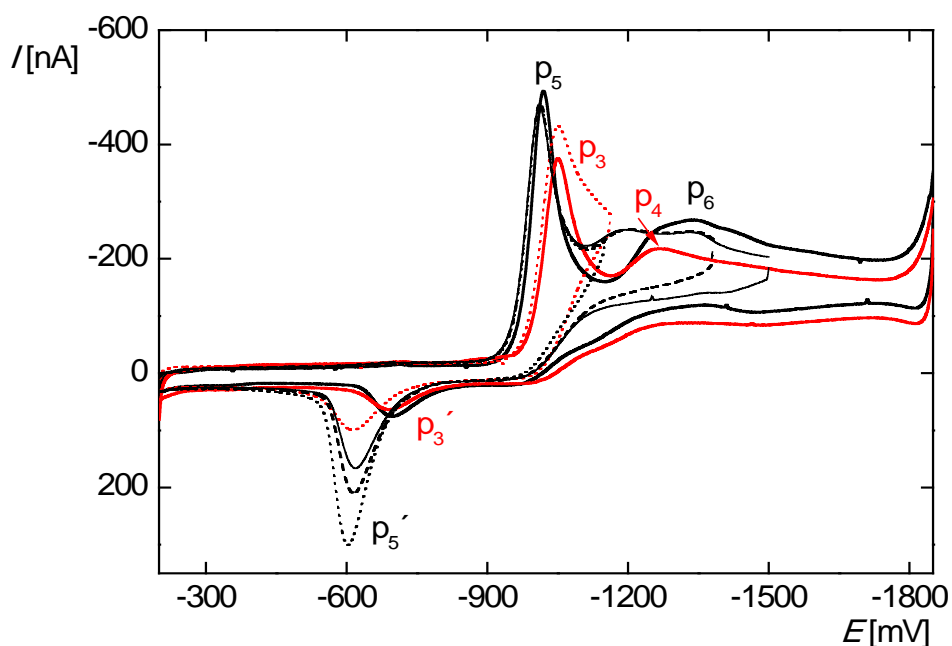
Cyklické voltamogramy 2-AFN na HMDE v prostředí DMF – BR pufr o pH 2,0 poskytují pouze jeden pík p₁, ale FN poskytuje dva zřetelně oddělené píky p₁ a p₂. Ani jedna látka neposkytuje anodický pík (obr. 49). I v neutrálním prostředí je vidět rozdílné chování 2-AFN a FN. FN poskytuje jeden pík p₃ a má zcela zřetelný i druhý katodický pík p₄ a také anodický pík p_{3'} (oproti 2-AFN); tyto píky jsou zanedbatelně malé oproti FN a je zde zřetelný pouze jeden katodický pík p₂ (obr. 50). V prostředí DMF – BR pufr o pH 13,0 (1:9) lze pozorovat dva zřetelně oddělené katodické píky u 2-AFN p₃ a p₄ a anodický pík p_{3'} a u FN katodický pík p₅ a p₆ a anodický pík p_{5'}. Z cyklických voltamogramů je patrné, že aminoskupina může mít jistý vliv na elektrochemické chování.



Obr. 49 Voltamogramy ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na HMDE v prostředí DMF – BR pufr o pH 2,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken FN (—) a první sken 2-AFN (—).



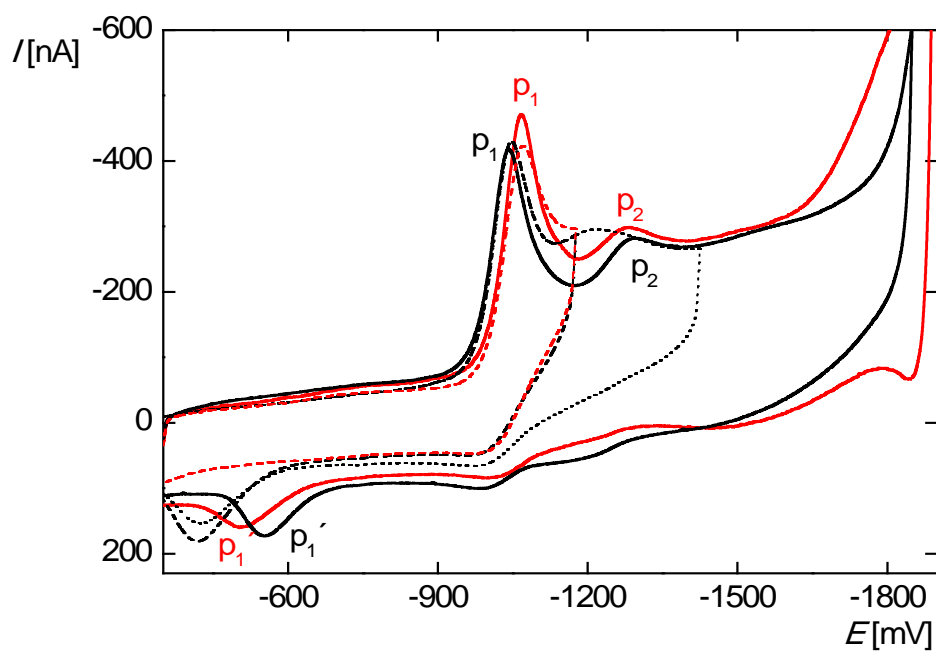
Obr. 50 Voltamogramy ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na HMDE v prostředí DMF – BR pufr o pH 7,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken FN (—) a první sken 2-AFN (—).



Obr. 51 Voltamogramy ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na HMDE v prostředí DMF – BR pufr o pH 13,0 (1:9). Rychlost polarizace 50 mV/s. První sken FN (—) a první sken 2-AFN (—).

8.3.2 Porovnání cyklické voltametrie na m-AgSAE

V prostředí DMF – BR pufr o pH 2,0 a 7,0 (1:9) na m-AgSAE se u obou látek objevuje pouze jeden dobře vyvinutý katodický pík, který je ireverzibilní. Cyklické voltamogramy naměřené v prostředí DMF – BR pufr o pH 13,0 (1:9) jsou zobrazeny na obr. 52 při rychlosti polarizace 500 mV/s, při které jsou píky výraznější než při nižší rychlosti polarizace. 2-AFN poskytuje v tomto prostředí dva katodické píky p_1 a p_2 a jeden anodický pík p_2' , stejně jako u FN. Na m-AgSAE není patrné rozdílné elektrochemické chování 2-AFN a FN.



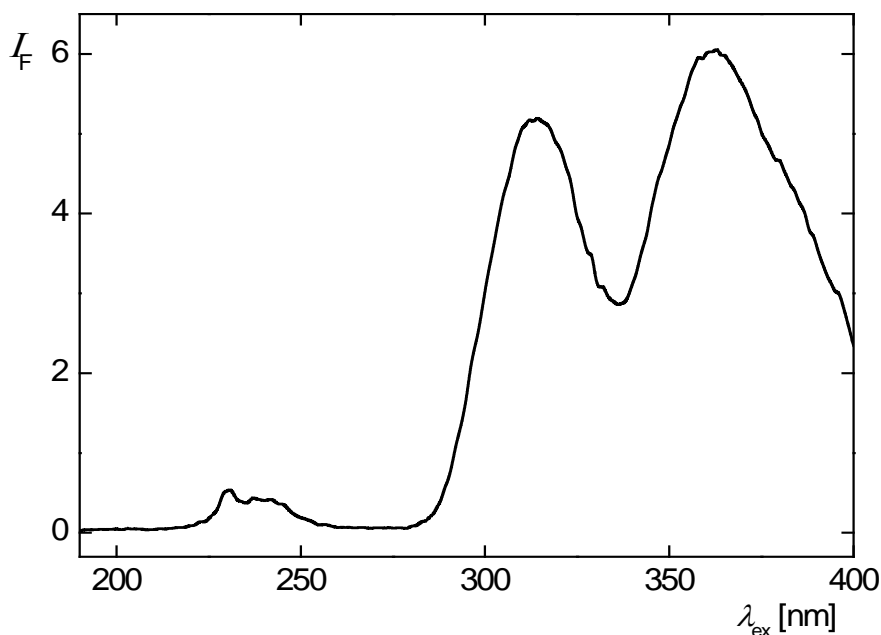
Obr. 52 Voltamogramy ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) na HMDE v prostředí DMF – BR pufr o pH 13,0 (1:9). Rychlost polarizace 500 mV/s. První sken FN (—) a první sken 2-AFN (—).

9. Fluorimetrické stanovení 2-aminofluoren-9-onu

9.1. Optimalizace podmínek pro fluorescenční měření

Jelikož 2-AFN je schopen fluoreskovat [7], bylo využito možnosti fluorimetrického stanovení 2-AFN v UV-Vis oblasti, které bylo provedeno za účelem srovnání s voltametrickým a již dříve provedeným polarografickým a spektrofotometrickým stanovením 2-AFN, především pak z hlediska dosažených mezí stanovitelnosti (L_Q) [1].

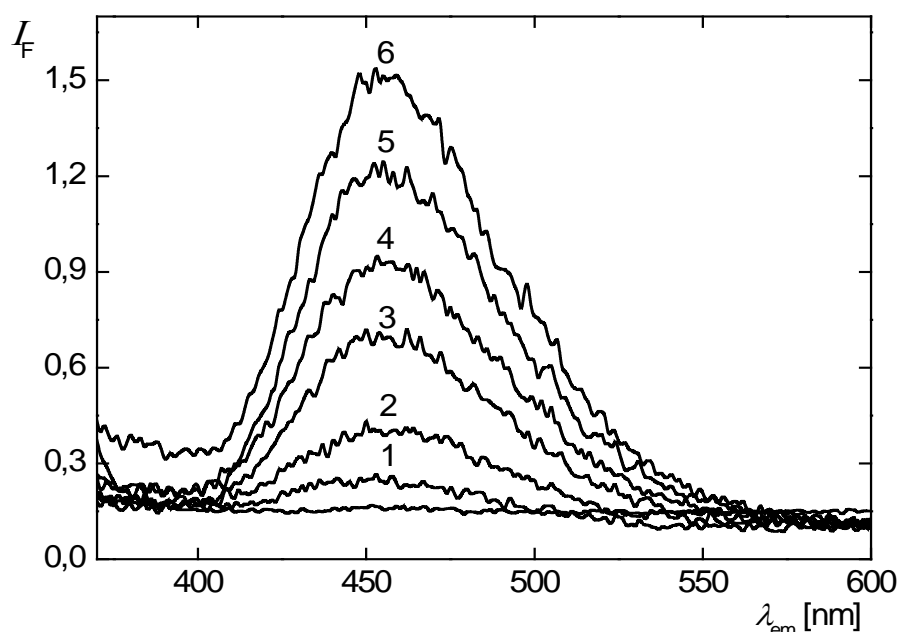
Nejprve bylo nutné najít optimální excitační (λ_{ex}) a emisní (λ_{em}) vlnovou délku pro měření koncentračních závislostí. Roztok 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) byl připraven v methanolu, který je vhodný pro fluorescenční měření, jelikož sám vykazuje v měřené oblasti prakticky nulovou fluorescenci. Orientačním měřením emisního spektra bylo získáno maximum píku při $\lambda_{em} = 460$ nm. Při této λ_{em} bylo proměřeno excitační spektrum od 190 do 400 nm (obr. 53), kdy byly získány dvě maxima při $\lambda_{ex1} = 314$ nm a $\lambda_{ex2} = 362$ nm. Jako optimální excitační vlnová délka pro emisní měření byla zvolena $\lambda_{ex1} = 314$ nm vzhledem k větší vzdálenosti od emisního maxima (460 nm).



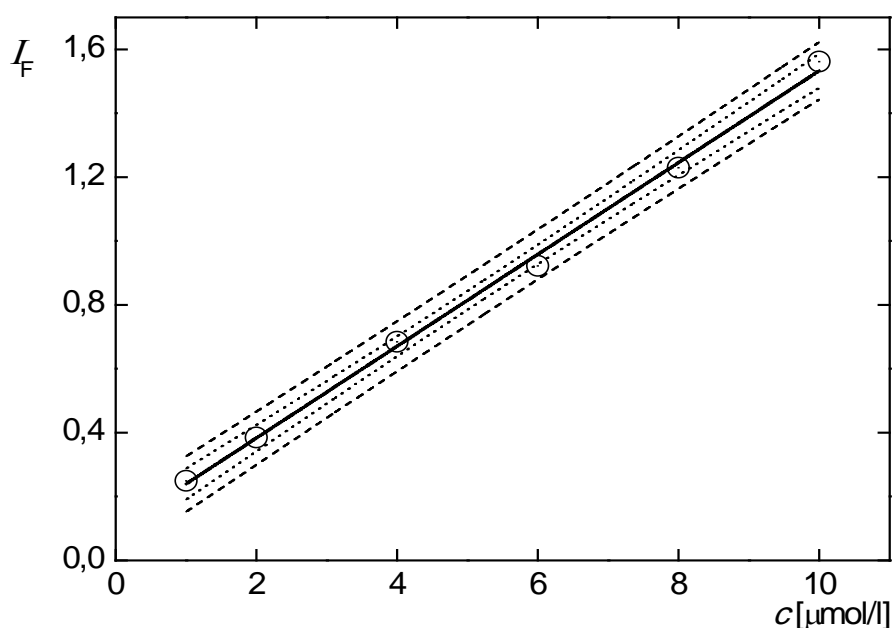
Obr. 53 Excitační fluorescenční spektrum 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) v prostředí methanolu měřené v 1,0 cm křemenné kyvetě při $\lambda_{em} = 460$ nm.

9.2. Koncentrační závislost odezvy 2-aminofluoren-9-onu

Závislost intenzity fluorescenčního záření (I_F) na koncentraci 2-AFN byla sledována v prostředí methanolu. Emisní spektrum 2-AFN bylo měřeno v oblasti 370 až 600 nm při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 314$ nm, kdy látka poskytuje jeden dobře vyvinutý pík s maximem při $\lambda_{em} = 460$ nm. Naměřená koncentrační závislost 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol/l není lineární, ale lze jí proložit polynomem druhého stupně popsaného příslušnou rovnicí. Dále bylo změřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l (obr. 54) a kalibrační závislost (obr. 55). Parametry kalibračních přímek pro fluorescenční stanovení 2-AFN jsou uvedeny v tabulce 18.



Obr. 54 Emisní spektrum 2-AFN v prostředí methanolu v rozmezí koncentrací 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l měřeno v 1,0 cm křemenné kyvetě při $\lambda_{ex} = 314$ nm. Koncentrace 2-AFN v (mol/l): 1×10^{-6} (1), 2×10^{-6} (2); 4×10^{-6} (3); 6×10^{-6} (4); 8×10^{-6} (5); 1×10^{-5} (6).



Obr. 55 Závislost intenzity fluorescenčního záření na koncentraci 2-AFN v prostředí methanolu koncentračním rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol/l měřeno v 1,0 cm křemenné kyvetě při $\lambda_{ex} = 314$ nm. Predikční (— — —) a konfidenční pásy (·····) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 18

Parametry kalibračních přímek fluorimetrického stanovení 2-AFN v prostředí methanolu měřené v 1,0 cm křemenné kyvetě při $\lambda_{ex} = 314$ nm.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	Směrnice [l/μmol]	Úsek	R^2	L_Q^a [mol/l]
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	— ^{b,c}	— ^{b,c}	— ^{b,c}	—
1×10^{-6} až 1×10^{-5}	$0,1438 \pm 0,0033$	$0,096 \pm 0,020$	0,9973	2×10^{-6}

^a – mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$), ^b – závislost není lineární, ^c – $I_F = (0,0825 \pm 0,0072)c^2$ [$\mu\text{mol}^2/\text{l}^2$] + $(-39,5 \pm 5,9)c$ [mmol/l] + $(0,92 \pm 0,19)$, $R^2 = 0,9941$).

10. Shrnutí výsledků

1. Bylo prostudováno elektrochemické chování 2-aminofluoren-9-onu (2-AFN) a za nalezených optimálních podmínek bylo provedeno jeho stanovení pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Jako optimální prostředí pro tyto techniky bylo zvoleno prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9). Regenerační potenciály na m-AgSAE pro optimální prostředí byly experimentálně zvoleny $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1200 \text{ mV}$.

2. Dále bylo využito akumulace 2-AFN na povrch elektrody, při které bylo v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 provedeno stanovení pomocí adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdSDPV) na HMDE při optimálních podmínkách akumulace $E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ a na m-AgSAE při $E_{\text{acc}} = +200 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$.

3. Využitím extrakce tuhou fází (SPE) a následného měření metodou AdSDPV na HMDE při $E_{\text{acc}} = +100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ v prostředí acetátového pufru o pH 4,0 bylo dosaženo dalšího snížení meze stanovitelnosti (L_Q).

4. Aplikovatelnost nově vyvinutých voltametrických metod stanovení 2-AFN byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody. Stanovení 2-AFN v pitné a říční vodě bylo pro zjednodušení měřeno v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná (říční) voda (1:9).

5. Také byl zkoušen nově zkonstruovaný miniaturizovaný systém elektrod a stanovení látky ve 100- μl objemu vzorku.

6. Bylo provedeno srovnávací fluorimetrické stanovení 2-AFN.

Měřená koncentrační rozmezí v optimálních prostředích a získané L_Q jsou pro porovnání uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19

Porovnání L_Q voltametrických a spektrofotometrických stanovení 2-AFN.

Technika / elektroda	Koncentrační rozmezí [mol/l]	Prostředí	L_Q [mol/l]
DCV / HMDE	1×10^{-7} až 1×10^{-4}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	2×10^{-7}
DPV / HMDE	1×10^{-7} až 1×10^{-4}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	1×10^{-7}
AdSDPV / HMDE	2×10^{-9} až 1×10^{-7}	acetátový pufr o pH 4,0	4×10^{-9}
DCV / m-AgSAE	1×10^{-7} až 1×10^{-4}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	2×10^{-7}
DPV / m-AgSAE	1×10^{-7} až 1×10^{-4}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	1×10^{-7}
AdSDPV / m-AgSAE	1×10^{-8} až 1×10^{-7}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	1×10^{-8}
DPV/ miniatur. systém elektrod s m-AgSAE	1×10^{-6} až 1×10^{-4}	methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9)	1×10^{-6}
AdSDPV / HMDE	konc. ve 100 ml	acetátový pufr o pH 4,0	2×10^{-10}
SPE ($k_{\text{teor}} = 10$)	1×10^{-10} až 1×10^{-9}		
AdSDPV / HMDE	konc. ve 100 ml	acetátový pufr o pH 4,0	4×10^{-11}
SPE ($k_{\text{teor}} = 100$)	2×10^{-11} až 1×10^{-10}		
Fluorimetrie	1×10^{-6} až 1×10^{-4}	methanol	2×10^{-6}
UV-Vis spektrofotometrie [1]	1×10^{-7} až 1×10^{-5}	methanol	1×10^{-7}

Z uvedených výsledků vyplývá, že L_Q dosažené pomocí nově vyvinutých voltametrických metod DCV a DPV na HMDE a m-AgSAE v optimálním prostředí methanol – BR pufr o pH 4,0 (1:9) jsou přibližně 1×10^{-7} mol/l (tato hodnota byla dosažena i v modelových vzorcích pitné a říční vody metodami DCV a DPV na HMDE a m-AgSAE v prostředí acetátový pufr o pH 4,0 – pitná (říční) voda (1:9).

L_Q získané pomocí voltametrických metod jsou o koncentrační řád nižší, než při srovnávacím fluorimetrickém stanovení, jehož další nevýhodou je nevhodnost pro stanovení 2-AFN v modelových vzorcích pitné a říční vody. Z již dříve získaných výsledků lze UV-Vis spektrofotometrické stanovení 2-AFN s přibližně stejnou L_Q považovat za alternativní analytickou metodu k voltametrickým metodám stanovení 2-AFN [1].

Pomocí akumulace 2-AFN na povrch HMDE bylo možné snížit hodnotu L_Q až o dva řády ($L_Q \approx 4 \times 10^{-9}$), a tím značným způsobem zvýšit citlivost DPV metody. Technikou AdSDPV v pitné vodě bylo proměřeno koncentrační rozmezí 2×10^{-9} až 1×10^{-7} mol/l a v říční vodě 2×10^{-8} až 1×10^{-7} mol/l. V říční vodě je L_Q při měření metodou AdSDPV přibližně o řád vyšší než v pitné vodě, což může být způsobeno matricí, která obsahuje mnoho jiných látek (např. povrchově aktivní látky), které se mohou konkurenčně adsorbovat na elektrodu.

SPE se ukázala jako velmi vhodná metoda pro realizaci stanovení 2-AFN v praxi; zde poskytne separaci a prekoncentraci analytu, a tím sníží hodnotu L_Q . Pomocí metody SPE z deionizované a pitné vody byl 2-AFN zkoncentrován ze 100 ml až do 1,0 ml ($k_{\text{teor}} = 100$), a následným měřením metodou AdSDPV bylo dosaženo až o dva koncentrační řády nižší hodnoty L_Q než bez využití SPE ($L_Q \approx 4 \times 10^{-11}$). V říční vodě bylo možné dosáhnout snížení hodnoty L_Q přibližně o řád. Metody SPE s následnou akumulací 2-AFN na povrch HMDE lze využít pro environmentální praxi, kde je předpokládán výskyt 2-AFN v akvatických systémech v nanomolárních až pikomolárních koncentracích.

Miniaturizovaný systém elektrod byl otestován při stanovení 2-AFN jako použitelný, ale dosažená hodnota $L_Q \approx 1 \times 10^{-6}$ mol/l není zcela uspokojivá (šum je nejspíše způsoben celkovým sestavením těla elektrody a vzhledem k jednoduchosti přípravy půjde v budoucnu jistě připravit prototyp s menším šumem). Kombinace voltametrických měření realizovaných ve 100- μ l či menších objemech s prekoncentrací analytu pomocí SPE může být využita pro snížení hodnoty L_Q . Lze předpokládat zkoncentrování analytu pomocí SPE z 1000 ml až na objem 100 μ l ($k_{\text{teor}} = 10\,000$).

Informace získané z coulometrických měření (CPC) na rtuťovém dně (MPE) potvrzují předpoklady uvedené v literatuře, ve které je redukce oxoskupiny popisována jako děj zahrnující výměnu dvou elektronů za vzniku alkoholové skupiny. Pro objasnění mechanismu redukce oxoskupiny 2-AFN byla použita technika cyklické voltametrie (CV) na HMDE a m-AgSAE. Pomocí CV na HMDE bylo zjištěno, že 2-AFN poskytuje v kyselém prostředí pouze jeden ireverzibilní katodický pík, který odpovídá jednomu dvouelektrodovému kroku. V neutrálním a zásaditém prostředí se objevují dva zřetelně oddělené katodické píky a jeden anodický a jedná se o kvazireverzibilní děje. První pík v neutrálním a zásaditém prostředí

odpovídá opět redukci oxoskupiny a děj, při kterém vzniká druhý pík, nebyl zcela objasněn. Bylo rovněž provedeno srovnání redukce 2-AFN a fluoren-9-onu (FN), při kterém bylo zřejmé rozdílné elektrochemické chování 2-AFN a FN na HMDE, což může být způsobeno vlivem přítomnosti aminoskupiny; tento jev nebyl pozorován na m-AgSAE.

Tato diplomová práce ukazuje, že i přes přehnané obavy z toxicity kovové rtuti představuje HMDE jednu z nejlepších pracovních elektrod pro stanovení elektrochemicky redukovatelných látek, zejména využitím možností akumulace látky na povrch elektrody. I v dnešní době fascinujících možností moderních spektrometrických a separačních metod hrají elektroanalytické metody svoji nezastupitelnou roli. Hlavními výhodami elektroanalytických metod jsou nízké pořizovací a provozní náklady, vysoká citlivost, přijatelná selektivita, snadná miniaturizovatelnost a automatizovatelnost a v neposlední řadě snadná přenosnost lehkých analytických přístrojů umožňující jejich použití v terénu při velkoplošném monitorování různých škodlivých organických látek [82].

11. Literatura

1. Hajkova, A. Polarografické stanovení genotoxického 2-amino-9-fluorenonu. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2010.
2. Hajkova, A.; Vyskocil, V.; Danhel, A.; Wang, J.; Barek, J. Polarographic and Voltammetric Determination of Genotoxic 2-Aminofluoren-9-one at Mercury Electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2011**, 76(12), 1775-1790.
3. Zeisig, M.; Moller, L. ³²P-HPLC Suitable for Characterization of DNA Adducts Formed *In Vitro* by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Derivates. *Carcinogenesis*, **1995**, 16(1), 1-9.
4. Sigma-Aldrich Bezpečnostní list (revize 30.8.2009, verze 3.0). URL: <http://www.sigmaaldrich.com> (31.3.2010),
5. 2-Amino-9-fluorenone. URL: <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/NH/2-AMINO-9-FLUORENONE.htm> (3.4.2010),
6. 2-Amino-9H-fluoren-9-one. URL: <http://www.guideschem.com/dictionary/3096-57-9.html> (15.2.2012),
7. Enoch, I. V. M. V.; Swaminathan, M. Fluorimetric Study on Molecular Recognition of Beta-cyclodextrin with 2-Amino-9-fluorenone. *Journal of Fluorescence*, **2006**, 16(4), 501-510.
8. Bandowe, B. A. M.; Sobocka, J.; Wilcke, W. Oxygen-containing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (OPAHs) in Urban Soils of Bratislava, Slovakia: Patterns, Relation to PAHs and Vertical Distribution. *Environmental Pollution*, **2011**, 159(2), 539-549.
9. Tsapakis, M.; Stephanou, E. G. Diurnal Cycle of PAHs, Nitro-PAHs, and Oxy-PAHs in a High Oxidation Capacity Marine Background Atmosphere. *Environmental Science and Technology*, **2007**, 41(23), 8011-8017.
10. Bandowe, B. A. M.; Shukurov, N.; Kersten, M.; Wilcke, W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Oxygen-containing Derivatives (OPAHs) in Soils from the Angren Industrial Area, Uzbekistan. *Environmental Pollution*, **2010**, 158(9), 2888-2899.
11. Goldfarb, J. L.; Suuberg, E. M. Vapor Pressures and Thermodynamics of Oxygen-containing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Measured Using Knudsen Effusion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2008**, 27(6), 1244-1249.
12. Ramdahl, T. Polycyclic Aromatic Ketones in Environmental-Samples. *Environmental Science and Technology*, **1983**, 17(11), 666-670.
13. Wischmann, H.; Steinhart, H. The Formation of PAH Oxidation Products in Soils and Soil/Compost Mixtures. *Chemosphere*, **1997**, 35(8), 1681-1698.
14. Sepic, E.; Bricelj, M.; Leskovsek, H. Biodegradation Studies of Polyaromatic Hydrocarbons in Aqueous Media. *Journal of Applied Microbiology*, **1997**, 83(5), 561-568.
15. Chupungars, K.; Rerngsamran, P.; Thaniyavarn, S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation by *Agrocybe* sp CU-43 and Its Fluorene Transformation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **2009**, 63(1), 93-99.
16. Lundstedt, S.; Persson, Y.; Oberg, L. Transformation of PAHs During Ethanol-Fenton Treatment of an Aged Gasworks' Soil. *Chemosphere*, **2006**, 65(8), 1288-1294.
17. Himaya, S. W. A.; Ngo, D. H.; Ryu, B.; Kim, S. K. An Active Peptide Purified from Gastrointestinal Enzyme Hydrolysate of Pacific Cod Skin Gelatin Attenuates Angiotensin-1 Converting Enzyme (ACE) Activity and Cellular Oxidative Stress. *Food Chem.*, **2012**, 132(4), 1872-1882.

18. Cizek, K.; Barek, J.; Fischer, J.; Peckova, K.; Zima, J. Voltammetric Determination of 3-Nitrofluoranthene and 3-Aminofluoranthene at Boron Doped Diamond Thin-film Electrode. *Electroanalysis*, **2007**, 19(12), 1295-1299.
19. Zima, J.; Dejmekova, H.; Barek, J. HPLC Determination of Naphthalene Amino Derivatives Using Electrochemical Detection at Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis*, **2007**, 19(2-3), 185-190.
20. Gu, Z. T.; Gorin, A.; Hingerty, B. E.; Broyde, S.; Patel, D. J. Solution Structures of Aminofluorene [AF]-stacked Conformers of the syn AF-C-8-dG Adduct Positioned Opposite dC or dA at a Template-primer Junction. *Biochemistry*, **1999**, 38(33), 10855-10870.
21. German, N.; Armalis, S.; Zima, J.; Barek, J. Voltammetric Determination of Fluoren-9-ol and 2-Acetamidofluorene Using Carbon Paste Electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2005**, 70(3), 292-304.
22. Moller, L. *In Vivo* Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic-hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives*, **1994**, 102, 139-146.
23. Pothuluri, J. V.; Sutherland, J. B.; Freeman, J. P.; Cerniglia, C. E. Fungal Biotransformation of 6-Nitrochrysene. *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**, 64(8), 3106-3109.
24. Barek, J.; Cvacka, J.; Muck, A.; Quaiserova, V.; Zima, J. Polarographic and Voltammetric Determination of Carcinogenic Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Electroanalysis*, **2001**, 13(8-9), 799-803.
25. Pumera, M.; Muzikar, J.; Barek, J.; Jelinek, I. Determination of Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Capillary Electrophoresis. *Analytical Letters*, **2001**, 34(8), 1369-1375.
26. Dutta, S.; Li, Y.; Johnson, D.; Dzantiev, L.; Richardson, C. C.; Romano, L. J.; Ellenberger, T. Crystal Structures of 2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene in Complex with T7 DNA Polymerase Reveal Mechanisms of Mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2004**, 101(46), 16186-16191.
27. Dollinger, M. D.; Hixon, S. C.; Sarraf, A. M.; White, W. E. Mutations and Cell-Transformation with 2-Azido-9-fluorenone Oxime. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association*, **1980**, 16(6), 541-546.
28. Kuo, H. M.; Ho, H. J.; Chao, P. D. L.; Chung, J. G. Quercetin Glucuronides Inhibited 2-Aminofluorene Acetylation in Human Acute Myeloid HL-60 Leukemia Cells. *Phytomedicine*, **2002**, 9(7), 625-631.
29. Brichac, J.; Zima, J.; Barek, J. HPLC Determination of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons after Their Reduction to Amino Derivatives. *Analytical Letters*, **2004**, 37(11), 2379-2392.
30. Vyskocil, V.; Barek, J. Electroanalysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Organic Chemistry*, **2011**, 15(17), 3059-3076.
31. 9-Fluorenone. URL:<http://chemicalland21.com/specialtychem/finechem/> (3.4.2010),
32. Li, Z. M.; Miao, X. R.; Xin, H. L.; Deng, W. L. Synthesis, Crystal Structures, Photophysical Properties and Self-assembly of Fluorene-based Bis-Schiff Bases. *Material Chemistry and Physics*, **2010**, 124(2-3), 1105-1112.
33. Carbas, B. B.; Kivrak, A.; Onal, A. M. A New Processable Electrochromic Polymer Based on an Electron Deficient Fluorene Derivative with a High Coloration Efficiency. *Electrochimica. Acta*, **2011**, 58, 223-230.
34. Lin, Y.; Chen, Y.; Ye, T. L.; Ma, D. G.; Li, Y. X. Carbazole-modified Blue Light-emitting Copolymers with The Backbones Integrated by Diphenyloxadiazole, Fluorene, and Triphenylamine. *European Polymer Journal.*, **2012**, 48(2), 416-424.

35. Lee, C. S.; Chang, H. H.; Jung, J.; Lee, N. A.; Song, N. W.; Chung, B. H. A Novel Fluorescent Nanoparticle Composed of Fluorene Copolymer Core and Silica Shell with Enhanced Photostability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, 91, 219-225.
36. Probst, G. S.; Thompson, C. Z.; Hill, L. E.; Epp, J. K.; Neal, S. B.; Oberly, T. J.; Bewsey, B. J. Identification of Genotoxins-A Correlation of Bacterial Mutation with Hepatocyte DNA-repair. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **1983**, 407(JUN), 334-350.
37. Stocksdales, M. G.; Fletcher, S. E. S.; Henry, I.; Ogren, P. J.; Berg, M. A. G.; Pointer, R. D.; Benson, B. W. Developing Investigation Skills in an Introductory Multistep Synthesis Using Fluorene Oxidation and Reduction. *Journal of Chemical Education*, **2004**, 81(3), 388-390.
38. Yang, G. Y.; Zhang, Q. H.; Miao, H.; Tong, X. L.; Xu, J. Selective Organocatalytic Oxygenation of Hydrocarbons by Dioxygen Using Anthraquinones and N-Hydroxyphthalimide. *Organic Letters.*, **2005**, 7(2), 263-266.
39. Tsao, R.; Eto, M. Light-activated Plant Growth Inhibitory Activity of cis-Dehydromatricaria Ester, Rose Bengal and Fluorene-9-one on Lettuce (*Lactuca Sativa* L). *Chemosphere*, **1996**, 32(7), 1307-1317.
40. Wilkes, H.; Clegg, H.; Disko, U.; Willsch, H.; Horsfield, B. Fluorene-9-ones and Carbazoles in The Posidonia Shale, Hils Syncline, Northwest Germany. *Fuel*, **1998**, 77(7), 657-668.
41. Loganathan, K.; Huang, F.; Pickup, P. G. Electrochemistry of Fluorene-9-one Based Conjugated Copolymers Analysis of Voltammograms and Correlation with Spectroscopic Data. *Electrochimica Acta.*, **2006**, 52(1), 15-23.
42. Vyskočil, V.; Polášková, P.; Bologa, P.; Barek, J., Sensing in Electroanalysis 4 In *Polarographic and Voltammetric Determination of Genotoxic 9-Fluorenone Using Mercury and Silver Solid Amalgam Electrodes*, Pardubice, 2009.
43. Armalis, S.; Novikova, N.; Kubiliene, E.; Zima, J.; Barek, J. Voltammetric Determination of 2-Aminofluorene and 2,7-Diaminofluorene Using Carbon Paste Electrode. *Analytical Letters*, **2002**, 35(9), 1551-1559.
44. Heflich, R. H.; Neft, R. E. Genetic Toxicity of 2-Acetylaminofluorene, 2-Aminofluorene and Some of Their Metabolites and Model Metabolites. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology*, **1994**, 318(2), 73-174.
45. Lee, M. E.; Urso, P. Suppression of T Lymphocyte Proliferation to Antigenic and Mitogenic Stimuli by Benzo(alpha)pyrene and 2-Aminofluorene Metabolites. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.*, **2007**, 29(3-4), 425-438.
46. Adris, P.; Chung, K. T. Metabolic Activation of Bladder Procarcinogens, 2-Aminofluorene, 4-Aminobiphenyl, and Benzidine by *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Human Endogenous Bacteria. *Toxicology in Vitro.*, **2006**, 20(3), 367-374.
47. Lu, K. H.; Lue, K. H.; Hsia, T. C.; Chou, M. C.; Lin, K. L.; Chung, J. G. Oral Administration of Paclitaxel Affects The Distribution and Metabolism of 2-Aminofluorene in Various Tissues of Sprague-Dawley Rats. *Phytomedicine*, **2005**, 12(8), 577-587.
48. Lin, S. S.; Hung, C. F.; Ho, C. C.; Liu, Y. H.; Ho, H. C.; Chung, J. G. Effects of Ellagic Acid by Oral Administration on N-Acetylation and Metabolism of 2-Aminofluorene in Rat Brain Tissues. *Neurochemical Research.*, **2000**, 25(11), 1503-1508.
49. Saha, S. K.; Dogra, S. K. Photoluminescence of 2-Aminofluorene: A Relook. *J. Mol. Struct.*, **1998**, 470(3), 301-311.

50. Saha, S. K.; Santra, S.; Dogra, S. K. Prototropic Equilibrium of 2-Aminofluorene in Non-ionic Micelles: Tweens. *Journal of Molecular Structure.*, **1999**, 478(1-3), 199-210.
51. Cerniglia, C. E.; Campbell, W. L.; Freeman, J. P.; Evans, F. E. Identification of A Novel Metabolite in Phenanthrene Metabolism by The Fungus *Cunninghamella-Elegans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1989**, 55(9), 2275-2279.
52. Cerniglia, C. E.; White, G. L.; Heflich, R. H. Fungal Metabolism and Detoxification of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons. *Archives of Microbiology*, **1985**, 143(2), 105-110.
53. Edler, B.; Zwiener, C.; Frimmel, F. H. Particle Beam LC/MS Screening of Polar Compounds of Contaminated Ground Water Samples from a Former Gas Plant. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1997**, 359(3), 288-292.
54. Dorie, L. D.; Bagley, S. T.; Leddy, D. G.; Johnson, J. H. Characterization of Mutagenic Subfractions of Diesel Exhaust Modified by Ceramic Particulate Traps. *Environmental Science and Technology*, **1987**, 21(8), 757-765.
55. Vyskocil, V.; Labuda, J.; Barek, J. Voltammetric Detection of Damage to DNA Caused by Nitro Derivatives of Fluorene Using an Electrochemical DNA Biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 397(1), 233-241.
56. Vyskocil, V.; Navratil, T.; Danhel, A.; Dedik, J.; Krejcova, Z.; Skvorova, L.; Tvrdikova, J.; Barek, J. Voltammetric Determination of Selected Nitro Compounds at a Polished Silver Solid Amalgam Composite Electrode. *Electroanalysis*, **2011**, 23(1), 129-139.
57. Vyskocil, V.; Navratil, T.; Polaskova, P.; Barek, J. Voltammetric Determination of Genotoxic Nitro Derivatives of Fluorene and 9-Fluorenone Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *Electroanalysis*, **2010**, 22(17-18), 2034-2042.
58. Moller, L.; Corrie, M.; Midtvedt, T.; Rafter, J.; Gustafsson, J. A. The Role of the Intestinal Microflora in the Formation of Mutagenic Metabolites from the Carcinogenic Air Pollutant 2-Nitrofluorene. *Carcinogenesis*, **1988**, 9(5), 823-830.
59. Moller, L.; Gustafsson, J. A. Liquid Chromatographic-mass Spectrometric Analysis of 2-Nitrofluorene and Its Derivatives. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **1986**, 13(12), 681-688.
60. Strniste, G. F.; Nickols, J. W.; Okinaka, R. T.; Whaley, T. W. 2-Nitrofluoren-9-one-A Unique Mutagen Formed in the Photooxidation of 2-Aminofluorene. *Carcinogenesis*, **1986**, 7(3), 499-502.
61. Carr, B. I. Pleiotropic Drug-resistance in Hepatocytes Induced by Carcinogens Administered to Rats. *Cancer Research*, **1987**, 47(21), 5577-5583.
62. Popp, F. D.; Kirsch, W. Synthesis of Potential Anticancer Agents.V. Schiff Bases and Related Compounds. *Journal of Organic Chemistry*, **1961**, 26(10), 3858-3860.
63. Vyskocil, V.; Barek, J. Mercury Electrodes-Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2009**, 39(3), 173-188.
64. Vyskocil, V.; Barek, J. Polarographic and Voltammetric Study of Genotoxic 2,7-Dinitrofluoren-9-one and Its Determination Using Mercury Electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2009**, 74(11-12), 1675-1696.
65. Murphy, R. S.; Barros, T. C.; Barnes, J.; Mayer, B.; Marconi, G.; Bohne, C. Complexation of Fluorenone and Xanthone to Cyclodextrins: Comparison of Theoretical and Experimental Studies. *The Journal of Physical Chemistry A*, **1999**, 103(1), 137-146.

66. Enoch, I.; Swaminathan, M. Stoichiometrically Different Inclusion Complexes of 2-Aminofluorene and 2-Amino-9-hydroxyfluorene in Beta-cyclodextrin: A Spectrofluorimetric Study. *Journal of Fluorescence*, **2006**, 16(5), 697-704.
67. Biczok, L.; Berces, T.; Yatsushashi, T.; Tachibana, H.; Inoue, H. The Role of Intersystem Crossing in The Deactivation of The Singlet Excited Aminofluorenones. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3(6), 980-985.
68. Biczok, L.; Cser, A.; Nagy, K. Substituent and Solvent Effects on The Photophysical Properties of 3-Azafluorenone Derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2001**, 146(1-2), 59-62.
69. Yatsushashi, T.; Nakajima, Y.; Shimada, T.; Tachibana, H.; Inoue, H. Molecular Mechanism for the Radiationless Deactivation of the Intramolecular Charge-transfer Excited Singlet State of Aminofluorenones through Hydrogen Bonds with Alcohols. *J. Phys. Chem. A*, **1998**, 102(45), 8657-8663.
70. Moog, R. S.; Burozski, N. A.; Desai, M. M.; Good, W. R.; Silvers, C. D.; Thompson, P. A.; Simon, J. D. Solution Photophysics of 1-Aminofluorenone and 3-Aminofluorenone-The Role of Intermolecular and Intramolecular Hydrogen-bonding in Radiationless Deactivation. *Journal of Physical Chemistry*, **1991**, 95(22), 8466-8473.
71. Murphy, R. S.; Moorlag, C. P.; Green, W. H.; Bohne, C. Photophysical Characterization of Fluorenone Derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1997**, 110(2), 123-129.
72. Mondal, J. A.; Samant, V.; Varne, M.; Singh, A. K.; Ghanty, T. K.; Ghosh, H. N.; Palit, D. K. The Role of Hydrogen-bonding Interactions in the Ultrafast Relaxation Dynamics of the Excited States of 3-and 4-Aminofluoren-9-ones. *ChemPhysChem*, **2009**, 10(17), 2995-3012.
73. Samant, V.; Singh, A. K.; Mukherjee, T.; Palit, D. K. Triplet Excited States and Radical Intermediates Formed in Electron Pulse Radiolysis of Amino-substituted Fluorenones. *Radiation Physics and Chemistry*, **2005**, 72(6), 711-722.
74. Thompson, P. A.; Simon, J. D. Electrolyte Effects on Molecular Radiationless Decay: The Photophysics of 3-Aminofluorenone in Acetonitrile-salt Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, **1992**, 97(7), 4792-4799.
75. Chow, F. K.; Grushka, E. High-performance Liquid-chromatography with Metal-solute Complexes. *Analytical Chemistry*, **1978**, 50(9), 1346-1353.
76. Ashworth, M. The Study of a Double-wave on the Polarographic Curves of Certain Aromatic Ketones and Aldehydes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1948**, 13, 229-251.
77. Day, R. A.; Milliken, S. R.; Shultz, W. D. Some Studies of the Polarography of Aromatic Ketones. *Journal of the American Chemical Society*, **1952**, 74(11), 2741-2744.
78. Day, R. A.; Kirkland, J. J. Polarography of Fluorenone, Anthrone and Benzophenone. *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, 72(6), 2766-2767.
79. Gary, J. T.; Day, R. A. Polarography of Some Aromatic Nitro and Carbonyl Compounds. *Journal of the Electrochemical Society*, **1960**, 107(7), 616-618.
80. Vyskocil, V.; Danhel, A.; Fischer, J.; Novotny, V.; Deylova, D.; Musilova-Karaova, J.; Maixnerova, L.; Peckova, K.; Barek, J. The Beauty and Usefulness of Novel Electrode Materials. *Chemické Listy*, **2010**, 104(12), 1181-1195.
81. Imamoglu, T.; Onal, A. M. Electrochemical Polymerisation of 2-Aminofluorene in Ethylalcohol/Water Medium. *European Polymer Journal*, **2004**, 40(8), 1875-1880.

82. Barek, J.; Peckova, K.; Vyskocil, V. Where Modern Electroanalytical Methods Verge Fifty Years after Nobel Prize for Polarography. *Chemicke Listy*, **2009**, 103(11), 889-893.
83. Matthias, O., *Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley-VCH: Weinheim 2007.
84. Harvey, D., *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill: Toronto, 2000.
85. Barek, J.; Peckova, K.; Vyskocil, V. Adsorptive Stripping Voltammetry of Environmental Carcinogens. *Current Analytical Chemistry*, **2008**, 4(3), 242-249.
86. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. Hoboken 2006.
87. Ooya, T.; Minabe, M.; Suzuki, K. Syntheses and Reactions of 10-(2,2'-biphenylene)-9-phenanthrene Derivatives and Some Consideration of Ethyl Isomers in Their Analogous Series. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1978**, 51(5), 1473-1476.